

Untersuchungen zur Replikation
des Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV)
in isolierten Zellkernen

Ellen Abernethy

Diss
München
1985

**Untersuchungen zur Replikation
des Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV)
in isolierten Zellkernen**

**Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

**vorgelegt von
Ellen Abernethy
München
1985**

**durchgeführt am
Max-Planck-Institut für Biochemie
Planegg/Martinsried
Abt.: Viroidforschung, Prof. Dr. H.L. Sänger**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau
- Sondergutachter: Prof. Dr. H.L. Sänger

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 1985

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern
und allen
meinen Lehrern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Problemstellung	4
3.	Ergebnisse	6
3.1.	Methodische Vorarbeiten für die Analyse der Nukleinsäuren aus isolierten Zellkernen	6
3.1.1.	Auswahl der Gelsysteme zur Trennung der RNA aus Zellkernen	6
3.1.2.	Nachweis der RNA im Gel durch Silberfärbung	10
3.1.2.1.	Nachweisgrenze der Silberfärbung	10
3.1.3.	Auswahl der Transfer- und Hybridisierungsmethoden zum Nachweis von PSTV RNA	13
3.1.3.1.	Transfer von Nukleinsäuren auf DBM-Papier (Northern Blotting) nach ALWINE et al. (1977)	13
3.1.3.2.	Transfer der Nukleinsäuren auf Nitrocellulose nach P. THOMAS (1980)	16
3.1.3.3.	Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose und Gene Screen (GST) Transfermembranen durch "Elektro"-Blotting	19
3.1.3.4.	Hybridisierung von ^{125}J -PSTV gegen PSTV und sRNA auf DBM-Papier nach ALWINE et al. (1977)	23
3.1.3.5.	Hybridisierung von ^{125}J -PSTV gegen PSTV und RNA aus Kartoffelzellen auf GST-Membran	25
3.2.	Isolation von Zellkernen aus Kartoffelzellen	27
3.2.1.	Zellkernisolation nach der Original-Methode von WILLMITZER und WAGNER (1981)	27
3.2.2.	Untersuchung der in gereinigten Kernen enthaltenen RNA	32
3.2.3.	Modifikation der Zellkernisolation	34
3.2.3.1.	Verkürzung des Verfahrens	34
3.2.3.2.	Modifikation der Detergenskonzentration	35
3.2.3.3.	Modifikation der Konzentration von Spermin und Spermidin	38
3.3.	Biochemische Charakterisierung der Zellkerne, die nach der modifizierten Methode isoliert worden waren	43

3.3.1.	Vergleich der RNA-Muster von gesunden und infizierten Zellkernen	43
3.3.2.	Messung der RNA-Synthese isolierter Zellkerne	44
3.3.2.1.	RNA-Synthese in Zellkernen aus Kartoffelsuspensionen	45
3.3.2.2.	Vergleich der Kerne aus Suspensions- und Kalluskulturen	46
3.3.2.3.	Einfluß des Alters der Zellsuspension auf die Polymeraseaktivität der daraus isolierten Kerne	48
3.4.	Nachweis von PSTV und PSTV-komplementärer RNA in isolierten Zellkernen durch molekulare Hybridisierung	50
3.4.1.	Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur	51
3.4.1.1.	^{125}J -PSTV als Hybridisierungsprobe	52
3.4.1.2.	(+)PSTV- und (-)PSTV-spezifische ^{32}P -markierte Oligodeoxyribonukleotide als Hybridisierungsprobe	57
3.4.2.	Nachweis von (+)PSTV- und (-)PSTV-Sequenzen in RNA von isolierten Zellkernen durch molekulare Hybridisierung mit Oligodeoxyribonukleotiden	63
3.4.3.	Untersuchung der Nukleinsäurenatur der (+) und (-)PSTV-Sequenzen in Zellkernen	68
3.5.	Ausarbeitung der Bedingungen für die <u>in vitro</u> RNA-Synthese mit isolierten Zellkernen	76
3.5.1.	Optimierung der Testpufferzusammensetzung	76
3.5.2.	Unterdrückung von RNase-Aktivität während der Zellkernisolation	76
3.5.3.	Voraussetzungen für die RNA-Synthese in isolierten Zellkernen	81
3.5.4.	Analyse der von isolierten Zellkernen <u>in vitro</u> synthetisierten RNA durch Gelelektrophorese und Autoradiographie	83
3.5.4.1.	Gelelektrophorese unter partiell denaturierenden Bedingungen	84

3.5.4.2.	Gelelektrophorese unter voll denaturierenden Bedingungen	85
3.5.4.3.	Zweimalige Elektrophorese unter partiell denaturierenden und unter denaturierenden Bedingungen	87
3.6.	Nachweis der Neusynthese von PSTV in isolierten Zellkernen durch Hybridisierung der <u>in vitro</u> Transkriptionsprodukte gegen Membrangebundene PSTV-Sequenzen	89
3.6.1.	Ermittlung der optimalen Hybridisierungsbedingungen mit ^{32}P -markierten Zellkern-Transkriptionsprodukten als Hybridisierungsprobe	90
3.6.2.	Nachweis der RNA-Natur der <u>in vitro</u> Transkriptionsprodukte	92
3.6.3.	Nachweis von (+) und (-)PSTV-Sequenzen in den ^{32}P -markierten Syntheseprodukten isolierter Zellkerne im "Dot-Blot"-Verfahren	94
3.6.4.	Voraussetzungen für die PSTV-Synthese in isolierten Zellkernen	97
3.6.4.1.	Hemmung der PSTV-Synthese durch alpha-Amanitin und Actinomycin D	
4.	Diskussion	104
4.1.	Zellkernisolation und -charakterisierung	105
4.2.	Nachweis PSTV-spezifischer Sequenzen durch molekulare Hybridisierung mit ^{125}J -PSTV	106
4.3.	Selektiver Nachweis von PSTV(+) und PSTV(-) RNA durch molekulare Hybridisierung mit (+)- bzw. (-)-spezifischen, ^{32}P -markierten Oligodeoxyribonukleotiden	108
4.4.	RNA-Natur der verschiedenen (+) und (-)PSTV-Moleküle	109
4.5.	<u>In vitro</u> -Synthese von PSTV in isolierten Zellkernen	111
4.6.	Nachweis von (+) und (-)PSTV RNA in den <u>in vitro</u> -Transkripten isolierter Zellkerne durch molekulare Hybridisierung mit membranfixier-	112

	ter, einzelsträngiger PSTV(-) bzw. PSTV(+)RNA	
4.7.	Inhibition der <u>in vitro</u> -Synthese von (+) und (-)PSTV in isolierten Zellkernen	113
4.8.	Gegenwärtiges Modell der PSTV-Replikation	114
5.	Material und Methoden	119
5.1.	Verwendete Chemikalien	119
5.2.	Zellkulturen	121
5.2.1.	Kulturbedingungen	121
5.2.2.	Kulturmedium	121
5.3.	Zellkernisolation	122
5.3.1.	Kernisolation nach WILLMITZER und WAGNER (1981)	123
5.3.2.	Modifizierte Zellkernisolation	125
5.3.3.	Bestimmung der Kernaussbeute	126
5.4.	Mikroskopie	127
5.4.1.	Fluoreszenzmikroskopie	127
5.4.2.	Phasenkontrastmikroskopie	128
5.4.3.	Ethidiumbromidfärbung der Kerne	128
5.4.4.	Mikrophotographie	128
5.5.	<u>In vitro</u> Transkription in isolierten Zellkernen	129
5.5.1.	³ H-UMP Inkorporation zur Untersuchung des Zeitverlaufs der Syntheseaktivität	129
5.5.1.1.	Reinigung der Syntheseprodukte durch Papierchromatographie nach RACKWITZ et al. (1981)	130
5.5.1.2.	Optimierung des Transkriptionspuffers	130
5.5.2.	³² P-UMP Inkorporation zur Nukleinsäureanalyse der Syntheseprodukte	131
5.5.2.1.	Reinigung der Syntheseprodukte durch Säulenchromatographie	131
5.5.2.2.	Hemmstoffversuche	131
5.5.2.3.	Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener RNase-Inhibitoren	132
5.6.	Nukleinsäureextraktion	133
5.6.1.	DNase- und RNase-Behandlung der Nukleinsäureextrakte aus isolierten Zellkernen	134

5.7.	Vorbereitung der RNA-Proben für die Gel-	135
	elektrophorese	
5.7.1.	Vollständig denaturierte RNA-Proben	135
5.7.2.	Partiell denaturierte RNA-Proben	136
5.7.3.	Native Proben	136
5.8.	Gelelektrophorese	136
5.8.1.	Herstellung der Polyacrylamidgele	137
5.8.1.1.	Partiell denaturierende Gele	138
5.8.1.2.	Native und voll denaturierende Gele	139
5.8.2.	Herstellung von Agarosegelen	140
5.8.2.1.	Vertikale Agarosegele	140
5.8.2.2.	Horizontale Agarosegele	141
5.8.3.	Herstellung von Agarose-Polyacrylamid-Gelen	141
5.9.	Methoden zum Nachweis der Nukleinsäuren in	142
	Gelen	
5.9.1.	Ethidiumbromidfärbung	143
5.9.2.	Silberfärbung	143
5.9.3.	Nachweis radioaktiver Banden durch Autoradio-	144
	graphie	
5.9.4.	Densitometrische Bestimmung der Intensität der	144
	Schwärzung eines Autoradiogramms	
5.10.	Methoden zur Übertragung der Nukleinsäuren auf	144
	ein Papierfilter	
5.10.1.	Transfer der Nukleinsäuren auf DBM-Papier	145
	durch Kapillarblotting nach ALWINE et al.	
	(1977)	
5.10.1.1.	Herstellung von Aminobenzylloxymethyl-Papier	145
	(ABM) und Diazotierung	
5.10.1.2.	Vorbereitung des Gels für den Transfer	145
5.10.1.3.	Nukleinsäuretransfer durch Kapillarblotting	146
5.10.2.	Transfer der Nukleinsäuren auf Nitrocellulose	147
	durch Kapillarblotting nach P.THOMAS (1980)	
5.10.3.	Transfer der Nukleinsäuren auf Gene Screen	147
	Transfer Membrane (von New England Nuclear	
	(NEN))	

5.10.4.	Transfer der Nukleinsäuren durch Elektro-	147
	blotting	
5.10.5.	Aufbringen der Nukleinsäuren auf Gene Screen	148
	im Dot-Blot-Verfahren	
5.11.	Methoden zur Hybridisierung radioaktiver Pro-	150
	ben an membranfixierte Nukleinsäuren zum Nach-	
	weis PSTV-spezifischer Sequenzen	
5.11.1.	Hybridisierung der DBM-Blots mit ^{125}J -PSTV zum	150
	Nachweis (+)- und (-)-spezifischer PSTV-	
	Sequenzen (nach ALWINE et al. (1977))	
5.11.2.	Hybridisierung der Nitrocellulose-Blots mit	151
	^{125}J -PSTV zum Nachweis (+)- und (-)-spezi-	
	fischer PSTV-Sequenzen (nach P.THOMAS 1980)	
5.11.3.	Hybridisierung der Gene Screen Blots mit ^{125}J -	152
	PSTV zum Nachweis (+)- und (-)-spezifischer	
	PSTV-Sequenzen	
5.11.4.	Hybridisierung der Gene Screen Blots mit ^{32}p -	153
	markierten Oligodeoxyribonukleotiden zum	
	getrennten Nachweis (+)- und (-)-spezifischer	
	PSTV-Sequenzen	
5.11.5.	Hybridisierung von ^{32}p -markierten Kern-Tran-	154
	skripten gegen Gene Screen-fixierte PSTV-	
	Sequenzen zum Nachweis der <u>in vitro</u> PSTV-	
	Synthese	
5.12.	Radioaktive Markierung der Hybridisierungs-	155
	proben	
5.12.1.	Markierung von reinem PSTV mit ^{125}I odine (nach	155
	COMMERFORD 1971)	
5.12.2.	Markierung der Oligodeoxyribonukleotide mit	157
	(γ - ^{32}p)-ATP durch T4 Polynukleotidkinase	
5.12.3.	Hitzedenaturierung der Hybridisierungsproben	158
5.12.4.	Alkali-Behandlung der <u>in vitro</u> Kerntran-	158
	skripte	
5.12.5.	Siliconisieren der Reaktionsgefäße	158
5.13.	Textverarbeitung der vorliegenden Arbeit	159
6.	Zusammenfassung	160

7.	Literaturverzeichnis	162
8.	Liste der verwendeten Abkürzungen	173

1.

Einleitung

Viroide sind subvirale Krankheitserreger höherer Pflanzen und verursachen bei Kartoffeln, Tomaten, Hopfen, Chrysanthemen, Avocado, Kokospalmen und Citrusgewächsen zum Teil verheerende Symptome. Seit ihrer Entdeckung vor etwa 12 Jahren wurden 11 verschiedene Viroide beschrieben, die man aufgrund ihrer Sequenzhomologie in vier Gruppen einordnen kann:

Zur PSTV-Gruppe gehören neben dem Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV): das Tomato Planta Macho Viroid (TPMV), das Tomato Apical Stunt Viroid (TASV), das Chrysanthemum Stunt Viroid (CSV) und das Citrus Exocortis Viroid (CEV), die sämtlich über 70% Sequenzhomologie zum PSTV aufweisen. Zur HSV-Gruppe gehört neben dem Hop Stunt Viroid (HSV) das Cucumber Pale Fruit Viroid (CPFV), die beide zum PSTV 55% homologe Sequenzbereiche aufweisen. Das Coconut Cadang Cadang Viroid (CCCV) und das Avocado Sunblotch Viroid (ASBV) sind jeweils Vertreter einer eigenen Gruppe, sie haben mit dem PSTV nur 11% bzw. 18% Sequenzhomologie. Die Zugehörigkeit des Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroids (CCMV) ist noch nicht geklärt, da seine Sequenz noch nicht bekannt ist, es dürfte sich jedoch wegen seiner abweichenden biologischen Eigenschaften um den Vertreter einer eigenständigen Gruppe handeln (SÄNGER, 1982, 1984; KIEFER, 1983; DIENER, 1984). Viroide sind einzelsträngige, zirkuläre RNA-Moleküle, die je nach Viroid-Art aus 240-380 Nukleotiden bestehen und die im Gegensatz zu konventionellen Viren nicht in ein Hüllprotein verpackt sind. Sie liegen vielmehr im nativen Zustand aufgrund intramolekularer Basenpaarung als stäbchenartige Strukturen vor, in denen sich doppelsträngige Bereiche mit ungepaarten Regionen ("loops") abwechseln (SÄNGER et al., 1976; RIESNER et al., 1979). Ihre ungewöhnlichen biochemischen und strukturellen Eigenschaften weichen sehr stark von denen aller bisher bekannten Krankheitserreger ab, was zu ihrer inten-

siven Untersuchung führte. Die in der relativ kurzen Zeit erzielten Ergebnisse wurden in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefaßt (DIENER, 1972a,b, 1974, 1979, 1984; SEMANCIK, 1976, 1979; DIENER und HADIDI, 1977; DICKSON, 1979; SÄNGER, 1979a,b, 1980a,b, 1982, 1984; GROSS und RIESNER, 1980; KLEINSCHMIDT et al., 1981; RIESNER, 1983;).

Da Viroide offensichtlich nicht in Polypeptide translatiert werden (WEPPRICH et al., 1974) und ihre potentielle genetische Information auch nicht ausreicht, um für die Synthese einer Viroid-spezifischen RNA-Polymerase zu codieren (SÄNGER, 1982), muß die Viroidreplikation vom RNA synthetisierenden und prozessierenden System abhängen, das in der Wirtszelle bereitsteht. In Viroid-infiziertem Pflanzengewebe wurden mit Hilfe molekularer Hybridisierung multimere Moleküle nachgewiesen, die zum infizierenden monomeren Viroid komplementär sind (GRILL und SEMANCIK, 1978; ROHDE und SÄNGER, 1981; BRANCH et al., 1981; OWENS und DIENER, 1982; ZELCER et al., 1982; MÜHLBACH et al., 1983). Dies führte zu der Hypothese, daß das infizierende zirkuläre Viroid-Molekül, die Viroid(+)RNA, in einem "rolling circle"-artigen Vorgang in eine komplementäre, d.h. Viroid(-)RNA, transkribiert wird, welche bis zu achtfach länger als das infizierende monomere Viroid-Molekül sein kann. Von dieser oligomeren (-)RNA werden dann wieder die Viroid(+)RNA-Stränge abgelesen, welche die Viroid-Nachkommenschaft bilden (BRANCH et al., 1984). Es war bisher unklar, wo sich diese Replikationsintermediären negativer Polarität in der Zelle befinden. Man kann jedoch davon ausgehen, daß dort, wo diese Formen zu finden sind, auch die Viroidsynthese stattfinden muß.

Die folgenden Befunde sprechen dafür, daß die Replikation der Viroide der PSTV-Gruppe und wahrscheinlich auch der HSV-Gruppe unter Beteiligung der nukleären RNA-Polymerasen im Zellkern stattfindet:

1. Der Hauptteil der Infektiosität des PSTV (DIENER, 1971) und des CEV (SÄNGER, 1972; SEMANCIK, 1976) ist mit der

Fraktion isolierter Zellkerne assoziiert und die PSTV RNA selbst akkumuliert im Kern, höchstwahrscheinlich im Nukleolus (SCHUMACHER et al., 1983).

2. Hemmstoffversuche mit alpha-Amanitin wiesen darauf hin, daß die nukleäre DNA abhängige RNA Polymerase II an der Biosynthese des PSTV beteiligt ist (MÜHLBACH und SÄNGER, 1979).

3. Isolierte und gereinigte DNA abhängige RNA Polymerase II aus Pflanzen ist in der Lage in vitro PSTV RNA komplett zu transkribieren (RACKWITZ et al., 1981).

Im Gegensatz zu den Viroiden der PSTV- und HSV-Gruppe scheinen das CCCV und das ASBV mit den Chloroplasten und den cytoplasmatischen Membranen assoziiert zu sein, so daß es denkbar ist, daß diese beiden Viroide nicht im Zellkern synthetisiert werden.

Bei früheren Versuchen, die Synthese des PSTV (TAKAHASHI und DIENER, 1976) und des CEV (FLORES und SEMANCIK, 1982) direkt in angereicherten Zellkernen aus infiziertem Pflanzengewebe nachzuweisen, wurde eine radioaktiv markierte niedermolekulare RNA gefunden, die mit der Bande der Viroid-RNA komigrierte. Allerdings wurde in diesen Experimenten die tatsächliche Viroidnatur dieser RNA nicht eindeutig geklärt, da keine voll denaturierenden Gelsysteme zur Trennung der Nukleinsäuren eingesetzt wurden und außerdem kein spezifischer Viroidnachweis durch molekulare Hybridisierung erfolgte. Zusätzlich ergaben sich bei den verschiedenen Untersuchungen widersprüchliche Befunde zur Hemmung der Viroidsynthese durch Actinomycin D.

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit mit Hilfe neuer experimenteller Wege eindeutige Aussagen über den Zellkern als tatsächlichen Ort der Synthese des PSTV zu machen und die dort synthetisierten Intermediärprodukte zu charakterisieren.

2. Problemstellung

Zur Prüfung der Hypothese, daß der Zellkern der Ort der PSTV-Replikation sei und daß nukleäre RNA-Polymerasen daran beteiligt sind, mußten zunächst verschiedene experimentelle Voraussetzungen geschaffen werden.

1. Zuerst mußte eine Methode zur Isolation von Zellkernen entwickelt werden, die zu Kernfraktionen führte, die frei von Kontaminationen waren, die ihre nukleäre RNA nicht verloren hatten und deren Polymeraseaktivitäten noch erhalten waren. Dazu dienten Suspensionkulturen von Solanum demissum.

2. In den isolierten Kernen, die diese Voraussetzungen erfüllten, sollten zusätzlich zur akkumulierten Viroid-RNA die Intermediärprodukte der Viroidreplikation nachgewiesen werden. Dies sollte durch molekulare Hybridisierung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Zellkern-RNA-Fraktionen mit ³²P-markierten (+) und (-)Viroid RNA-spezifischen Oligodeoxyribonukleotiden geschehen, da nur so die Viroid-Sequenzen selektiv erfaßt und hinsichtlich ihrer Polarität unterschieden werden können.

3. Es sollte dann festgestellt werden, ob es sich bei den nachgewiesenen PSTV-spezifischen Molekülen um DNA oder RNA handelt, ob sie einzelstränge Moleküle sind oder ob sie in vollständiger oder teilweiser Doppelsträngigkeit vorliegen.

4. Mit den isolierten Kernen sollten in vitro-Transkriptionsversuche durchgeführt werden, um festzustellen, ob Kerne aus Viroid-infizierten Zellen in der Lage sind, Viroid-Moleküle de novo zu synthetisieren. Der Nachweis der neusynthetisierten PSTV RNA in der Masse der endogenen Transkriptionsprodukte der Zellkerne sollte ebenfalls durch molekulare Hybridisierung erfolgen. Radioaktiv markierte neusynthetisierte PSTV (+) und (-)RNA sollte dabei mit Hilfe filtergebundener PSTV Proben von (-) und (+) Polarität getrennt nachgewiesen werden.

5. Durch Hemmstoffversuche sollte schließlich festgestellt werden, welche der nukleären RNA-Polymerasen an der Synthese von PSTV (+) und PSTV (-)RNA beteiligt sind.

Als Ausgangsmaterial für die Zellkernisolation wurde eine Suspensionskultur von Solanum demissum, einer Wildkartoffel-Art, gewählt.

- Suspensionskulturen unterliegen keinen jahreszeitlich bedingten Schwankungen der Wachstumsbedingungen, da sie unter konstanten Bedingungen gezüchtet werden können. Infolgedessen stellen die Zellen im Hinblick auf den Differenzierungsgrad und den physiologischen Zustand ein weitgehend einheitliches und vor allem gut reproduzierbares biologisches Material dar.

- PSTV-infizierte Kallus- und Suspensionskulturen sind in der Lage, über Jahre hinweg mit hoher Effizienz Viroid zu synthetisieren (MÜHLBACH und SÄNGER, 1981; MÜHLBACH et al., 1983) und bieten somit jederzeit Viroid-infiziertes Zellmaterial gleicher Qualität und gleichen genetischen Ursprungs.

Aus diesen Gründen eignen sich Suspensionskulturen besonders gut als Ausgangsmaterial für die Isolation von Zellkernen.

3. Ergebnisse

3.1. Methodische Vorarbeiten für die Analyse der Nukleinsäuren aus isolierten Zellkernen

3.1.1. Auswahl der Gelsysteme zur Trennung der RNA aus Zellkernen

Da die gereinigten Kerne Nukleinsäuren der unterschiedlichsten Kettenlängen enthalten, war es nötig, ein Gelsystem zur Verfügung zu haben, dessen Auflösungsvermögen sowohl im nieder- als auch im hochmolekularen Bereich zufriedenstellend ist. Es wurden daher verschiedene Polyacrylamid- und Agarosegele sowie Mischgele aus Polyacrylamid und Agarose getestet. Da die Agarosen verschiedener Hersteller unterschiedliche Eigenschaften aufwiesen, wurde innerhalb der Agarosen eine Vorauswahl getroffen und die mit den besten Trenneigenschaften zum Vergleich mit den anderen Gelsystemen herangezogen.

Folgende Agarosen wurden aufgrund ihrer vom Hersteller beschriebenen Trenneigenschaften ausgewählt und miteinander verglichen: Serva Nr. 11401, Seakem HGT(P), BRL Nr. 5510 und BRL Nr. 5517 "low melting". Dazu wurde RNA aus PSTV-infizierten und gesunden Tomatensuspensionszellen (Lycopersicon esculentum) und aus PSTV-infizierten und gesunden Kartoffelsuspensionszellen (Solanum demissum) sowie gereinigtes PSTV auf einem 1,5%igen Agarosegel (LOCKER, 1979) elektrophoretisch getrennt und die Qualität der Trennung nach Färbung mit Ethidiumbromid beurteilt.

Die beste Auflösung wurde mit der Agarose Nr.5510 von BRL beobachtet, die daher für alle weiteren Versuche eingesetzt wurde.

In Tabelle 1 sind alle getesteten Gelsysteme miteinander verglichen, wobei neben dem Auflösungsbereich und der Trennschärfe auch Probleme der praktischen Handhabbarkeit berücksichtigt wurden. Aus diesen Versuchen kristallisierte sich das 3,5% Polyacrylamid-Phosphat-Gel mit

glyoxalierten RNA-Proben als das geeignetste heraus. Die Banden waren scharf, das Auflösungsvermögen über den gesamten Bereich von >28S bis zur 4S RNA sehr gut. Es können native und vollständig denaturierte (glyoxalierte) Proben auf einem Gel verglichen werden und der Nachweis durch Silberfärbung ist, im Gegensatz zu Agarosegelen, möglich, wodurch eine hohe Nachweisempfindlichkeit erreicht wird (vergl. Kap. 3.1.2.1.). Außerdem bedarf dieses Gel für den Transfer der aufgetrennten Nukleinsäuren auf Membranfilter (für die Hybridisierung) keiner weiteren Behandlung. Die ebenfalls getesteten Harnstoffgele müssen hingegen für den Nukleinsäuretransfer vom Harnstoff befreit werden, da dieser die Bindung der Nukleinsäuren an die Membran stört. Außerdem werden die Nukleinsäuren durch den Harnstoff nicht vollständig denaturiert. Es ist daher nie klar, in welcher Form die RNA vorliegt, so daß keine eindeutigen Aussagen über ihre Größe möglich sind.

Das Polyacrylamid-Phosphat-Gel ist ein relativ unkompliziertes Gel-System, das die Anforderungen an Auflösungsvermögen und Nachweisempfindlichkeit erfüllt, und es wurde deshalb für alle weiteren gelelektrophoretischen Untersuchungen eingesetzt.

Tabelle 1:

Übersicht über die verschiedenen Gelsysteme, die zur Auftrennung von RNA aus Zellkernpräparationen eingesetzt wurden

Gelart	Aufbau	Probleme	Bedingungen	Trennbe- reich	Trennung von C und L ¹ PSTV	Eignung für RNA-Transfer
1,5% Agarose	vertikal	Taschen reißen leicht beim Kamm ziehen	nicht denatu- rierend *	>28S-5S	--	geeignet für Kapillar- u. Elektroblotting
1,5% Agarose + 6M Harnstoff	vertikal	wie oben & Gel sackt beim Lauf in sich zusammen	partiell denatu- rierend	>28S-5S	--	nur für Elektroblotting, Bindungskapazität reduziert
1,5% Agarose	horizont. "submarin"	/	nicht denatu- rierend *	>28S-5S	--	geeignet
1,5% Agarose + 6M Harnstoff	horizont. "submarin"	/	partiell denatu- rierend	>28S-5S	--	nur für Elektroblotting, Bindungskapazität reduziert
Mischgel: 3% PAA + 0,5% Agarose, pH 3,7°C	vertikal	heiße Agarose beschleunigt die Polymerisation; Gel wird zu schnell fest	nicht denatu- rierend	>28S-5S	--	geeignet
Mischgel wie oben + 8M Harnstoff	vertikal	wie oben, wird noch schneller fest, z.H. bevor es fertiggegossen ist	partiell denatu- rierend	>28S-5S	--	nur für Elektroblotting, Bindungskapazität reduziert

5% PAA + 8M Harnstoff, TEB, 70°C	vertikal	/		partiell denatu- rierend	>16S-4S	--	nur für Elektrophoretik, Bindungskapazität reduziert
5% PAA + 8M Harnstoff, 1/4 TEB, 37°C	vertikal	/		partiell denatu- rierend	>16S-4S	+	nur für Elektrophoretik, Bindungskapazität reduziert
10% PAA + 8M Harnstoff, 1/4 TEB	vertikal		wird durch hohe Spannung sehr heiß, erfordert daher spezielle Glasplatten	partiell denatu- rierend	>8S	--	nur für Elektrophoretik, Bindungskapazität reduziert
5% PAA, 10mM Phosphat-Puffer	vertikal	/		nativ + vollst. denatu- rieren	>16S-4S	(+)	geeignet
3,5% PAA, 10mM Phosphat-Puffer	vertikal	/		nativ + vollst. denatu- rieren	>28S-5S	(+)	geeignet

"*": voll denaturierend, wenn die Proben vor dem Lauf glyoxaliert werden.

"C": zirkuläres PSTV

"1": lineares PSTV

"(+)": nativ, aber mit glyoxalierten Proben vollständig denaturierend

"--": keine Trennung von zirkulärem und linearem PSTV

"+": zirkuläres und lineares PSTV werden aufgetrennt

"/": keine Probleme bei der Gelherstellung

"Trennbereich": RNA-Arten, die in diesem Gelsystem aufgetrennt werden können

28S, 16S und 5S RNA: ribosomale RNA, 4S RNA: transfer RNA

3.1.2. Nachweis der RNA im Gel durch Silberfärbung

Im Gegensatz zur Ethidiumbromidfärbung ist die Silberfärbung (GOLDMAN und MERRIL, 1982) geeignet, Proben in nativem und vollständig denaturiertem Zustand zu färben. Zur Visualisierung der Banden ist keine UV-Anregung nötig und die Färbung der Banden bleibt auch nach dem Trocknen des Gels erhalten, so daß auch das Gel selbst zur Dokumentation geeignet ist. Aufgrund dieser Vorteile wurde die Silberfärbung zum Nachweis der RNA aus Zellkernen eingesetzt und zuerst die Nachweisgrenze bestimmt.

3.1.2.1. Nachweisgrenze der Silberfärbung

Die Nachweisgrenzen wurden sowohl für DNA als auch für RNA bestimmt, indem verschiedene Mengen pBR 322 Plasmid DNA, die mit Restriktionsendonuklease Hinf I fragmentiert worden war, sowie PSTV und 5S RNA aus Kaninchenleber gelelektrophoretisch getrennt und gefärbt wurden (Abb. 1).

Dabei ließen sich für die pBR 322-Fragmente und für die 5S RNA (Abb. 1a und b) die Nukleinsäuremenge pro Bande genau bestimmen. Dies war beim PSTV nicht möglich, weil die Gesamtmenge in den Banden der zirkulären und der linearen Form unbekannt war (Abb. 1c). Daher konnte die Empfindlichkeit für RNA nur mit der 5S RNA (Abb. 1b) exakt bestimmt werden. Nach vollständiger Spaltung der pBR 322 Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease Hinf I erhält man Fragmente, die 1631, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154 und 75 Nukleotide lang sind. Sie liegen in äquimolaren Mengen vor, so daß durch die Länge des jeweiligen Fragments die in der Bande vorliegende Menge an DNA bestimmt wird. Es wurden verschiedene Verdünnungen zwischen 1ng und 50ng auf das Gel aufgetragen und jeweils für die letzte sichtbare Bande die Nukleinsäuremenge berechnet. Die niedrigste, noch gut sichtbare DNA-Menge enthielt die Bande mit den 221 Nukleotide langen Fragmenten in der Probe mit insgesamt 5ng DNA. 221 Nukleotide

entsprechen 5,08% der gesamten DNA und damit 5,08% von 5ng, d.h. $0,25\text{ng}/8\text{mm}^2$ (Abb. 1a, Bahn 2). Dies entspricht einer Empfindlichkeit von $0,03\text{ng}/\text{mm}^2$ und somit den Angaben von GOLDMAN und MERRIL (1982).

Die Empfindlichkeit für RNA war wesentlich geringer, hier waren nur $6,6\text{ng}/\text{mm}^2$ noch gut nachweisbar (Abb. 1b).

Damit ist die Empfindlichkeit der Silberfärbung für DNA etwa um den Faktor 20 höher als die der Färbung mit Ethidiumbromid, bei der nur Banden mit etwa $5\text{ng}/\text{mm}^2$ DNA noch visualisiert werden können. Da die Empfindlichkeit der Ethidiumbromidfärbung für RNA etwa um den Faktor 25 geringer ist als für DNA (persönliche Mitteilungen von Herrn Prof.Dr.W.Müller) erwies sich die Silberfärbung auch zum Nachweis von RNA wegen ihrer wesentlich niedrigeren Nachweisgrenze als die geeignetste Methode. Damit war zur Visualisierung der Kern-RNA eindeutig der Silberfärbung der Vorzug zu geben.

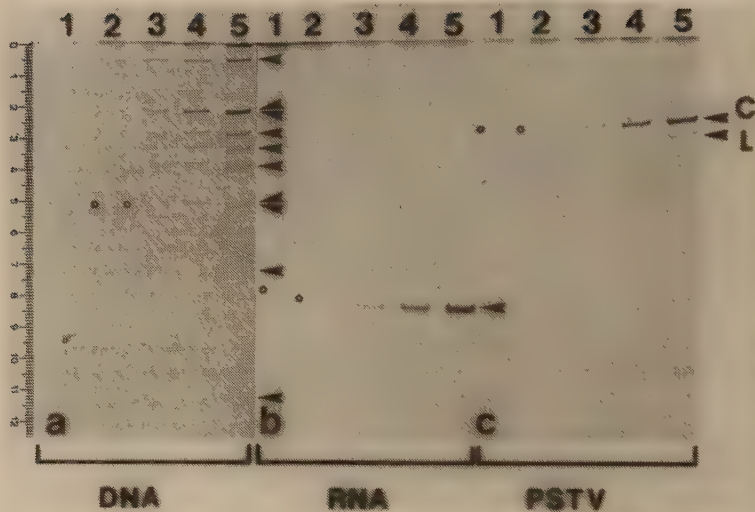


Abbildung 1:

5% Polyacrylamidgele mit glyoxalierten Nukleinsäuren zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Silberfärbung (GOLDMAN und MERRIL, 1982) für DNA und RNA. Die jeweils kleinste sichtbare Nukleinsäuremenge ist durch Ringe links und rechts der Banden markiert.

Abb. 1a zeigt eine Verdünnungsreihe von *Hinf* I-fragmentierter pBR 322 DNA. Bahn 1 enthält 1ng, Bahn 2: 5ng, Bahn 3: 10ng, Bahn 4: 20ng und Bahn 5: 50ng DNA, die sich äquimolar auf die 10 Banden der verschiedenen langen Fragmente verteilen. Die Banden (Pfeile!) enthalten von oben nach unten Fragmente mit folgender Nukleotidzahl: 1631, 517, 506, 396, 344, 298, 222, 221, 154 und 75 und somit 37,4%, 11,9%, 11,6%, 9,0%, 7,9%, 6,8%, 5,1%, 5,1%, 3,5% und 1,7% der Gesamt-DNA-Menge der Probe.

Abb. 1b zeigt eine Verdünnungsreihe mit 5S RNA aus Kaninchenleber, Abb. 1c eine Verdünnungsreihe mit PSTV. Bahn 1 enthält jeweils 5ng, Bahn 2: 10ng, Bahn 3: 20ng, Bahn 4: 50ng und Bahn 5: 100ng RNA.

(Abbildung 1, Fortsetzung)

Dieser Vergleich zeigt, daß mit Hilfe der Silberfärbung nach GOLDMAN und MERRIL (1982) noch ca. $0,03\text{ng/mm}^2$ DNA und ca. $6,6\text{ng/mm}^2$ RNA nachgewiesen werden können.

3.1.3. Auswahl der Transfer- und Hybridisierungsmethoden zum Nachweis von PSTV RNA

Das Prinzip der molekularen Hybridisierung beruht auf der Basenpaarung zwischen komplementären Nukleotid-Sequenzen, so daß man mit einer geeigneten radioaktiven Probe alle dazu komplementären Sequenzen selektiv erfassen und durch Autoradiographie sichtbar machen kann. Für die Auswahl der geeignetsten Methode zum Nachweis von PSTV wurde als radioaktive Probe ^{125}Jod -markiertes PSTV eingesetzt. Diese Möglichkeit, die gesuchte Sequenz als Probe einzusetzen besteht nur, weil das PSTV-Molekül eine hohe Selbstkomplementarität aufweist und unter geeigneten Umständen nicht nur intra-, sondern auch intermolekulare Hybride bilden kann. Um die Nachweismethode zu optimieren, wurden verschiedene Techniken des Nukleinsäuretransfers und der molekularen Hybridisierung getestet.

3.1.3.1. Transfer von Nukleinsäuren auf DBM-Papier (Northern Blotting) nach ALWINE et al. (1977)

Zunächst mußte aus Whatman 540 Filterpapier Aminobenzyloxymethyl-Papier (ABM) hergestellt werden, das bei 4°C im Exsiccator gelagert und kurz vor dem Nukleinsäuretransfer diazotiert wurde. Für den Test dieses Materials wurden RNA-Proben mit bekannter Zusammensetzung (PSTV und 2M LiCl-lösliche RNA (srRNA) in den Verhältnissen 1:1, 1:5 und 1:10) und ^{32}P -markierte Kern-RNA über ein 5%iges Polyacrylamidgel getrennt, das für den Transfer alkalibehandelt und in Transferpuffer equilibriert wurde. Es mußte darauf geachtet werden, daß Gelbehandlung und Diazotierung etwa zur gleichen Zeit abgeschlossen wurden, da das DBM-Papier nur von begrenzter Stabilität ist (ALWINE et al.,

1977). Der Transfer der Nukleinsäuren vom Gel auf das Papier erfolgte in 25mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 6.5 durch Übersaugen über Nacht. Diese Methode beruht auf dem Löschpapier-Effekt (daher der englische Name "blotting"), bei dem durch die Kapillarwirkung des Filterpapierstapels über Gel und DBM-Papier ("Blot") Transferpuffer durch Gel und DBM-Papier hindurchgesaugt wird und dabei die Nukleinsäuren aus dem Gel auf den "Blot" mitnimmt. Dabei ist darauf zu achten, daß der Puffer nur durch das Gel und nicht seitlich am Gel vorbei diffundieren kann, was den Transfer natürlich beeinträchtigt. Durch anschließendes "Backen" der "Blots" in Vakuum (2h bei 80°C) wurden die transferierten Nukleinsäuren kovalent an das DBM-Papier gebunden. Darin unterscheidet sich dieses Verfahren von allen übrigen, bei denen Nitrocellulose und ähnliche Materialien als Transfermembran eingesetzt werden, da bei diesen keine kovalente Bindung der Nukleinsäuren an das Filter erfolgt.

Das Gel wurde nach dem Transfer getrocknet und zusammen mit dem gebackenen "Blot" autoradiographiert. Die auf dem Gel ebenfalls aufgetrennten, nicht radioaktiven, PSTV und 2M LiCl-lösliche RNA (sRNA) enthaltenden Proben sind bei diesem Verfahren vor der Hybridisierung natürlich nicht sichtbar, so daß die Abschätzung der Transfereffizienz nur anhand der ^{32}P -markierten Zellkern-RNA erfolgen konnte. Die Schwärzung des Films durch die polydisperse radioaktive Kern-RNA war bei Gel und "Blot" nicht gleichmäßig und es zeigte sich, daß die im Gel schneller gewanderten RNA-Stücke effizienter transferiert worden waren als die langsameren. Insgesamt waren ungefähr 50% der Nukleinsäuren vom Gel auf das Papier gesaugt und gebunden worden (Abb.2a und b).

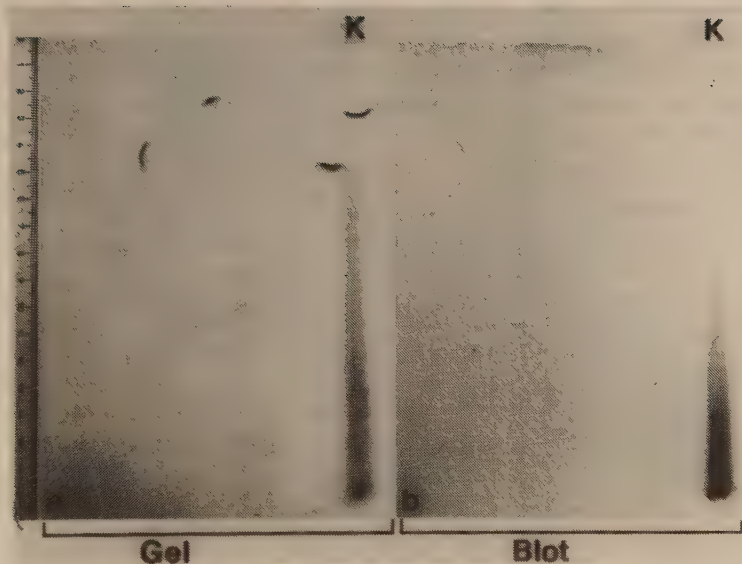


Abbildung 2:

Autoradiogramm eines 5% Polyacrylamidgels mit 8M Harnstoff in TEB (Abb. 2a) und DBM-Northernblot (ALWINE et al., 1977) nach "Kapillar"-Blotting (Abb. 2b) vor der Hybridisierung (vergl. Abb. 7). Als Kontrolle für die Effizienz des Transfers wurden radioaktiv markierte Syntheseprodukte von isolierten Zellkernen mitgetrennt und transferiert: Bahn K. Der Vergleich von Gel und "Blot" zeigt, daß im niedermolekularen Bereich nur etwa 50% der Nukleinsäuren transferiert werden und im höhermolekularen kaum noch ein Transfer erfolgt.

3.1.3.2. Transfer der Nukleinsäuren auf Nitrocellulose nach P. THOMAS (1980)

Der Transfer der gelelektrophoretisch getrennten Nukleinsäuren auf Nitrocellulose, die zuvor in 20xSSC equilibriert worden war, erfolgte auch hier durch Kapillarkraft über Nacht, jedoch wird das Gel vorher weder alkalibehandelt noch im Transferpuffer (20xSSC) equilibriert. Es wurden Kontrollversuche durchgeführt, bei denen das Gel vor dem Transfer mit NaOH behandelt wurde, um die Transferrate zu erhöhen. Der "Blot" wurde nach dem Transfer 4h bei 80°C im Vakuum gebacken, wobei die Nukleinsäuren an die Membran fixiert, aber nicht kovalent gebunden werden. Allerdings lassen sich Polyacrylamidgele, die Harnstoff in hohen Konzentrationen enthalten, nicht verwenden, da sie weicher sind als Harnstoff-freie Gele und dadurch während des Transfers in die im Vergleich zu DBM-Papier wesentlich porösere Nitrocellulose hineingedrückt werden, wodurch eine Trennung der beiden Schichten nicht mehr möglich ist.

Wie Abb. 3 zeigt, ist die Effektivität des Transfers extrem abhängig von der Größe der RNA, nur niedermolekulare RNA wird gut transferiert. Ab einer Kettenlänge von etwa 200 Nukleotiden wird RNA mit zunehmender Länge immer schlechter übertragen, auch das 359 Nukleotide lange PSTV ist auf dem "Blot" fast nicht mehr zu erkennen. Im hochmolekularen Bereich bleibt der größte Teil der Nukleinsäuren auf dem Gel (Abb.3a und b). Selbst eine Behandlung des Gels mit NaOH vor dem Transfer bewirkte nur eine geringe Erhöhung des Transfers (Abb.3c und d). Spätere Versuche zeigten außerdem, daß die so gewonnenen "Blots" nach der Hybridisierung eine extreme Hintergrundradioaktivität aufwiesen und auch aus diesem Grund nicht geeignet waren.

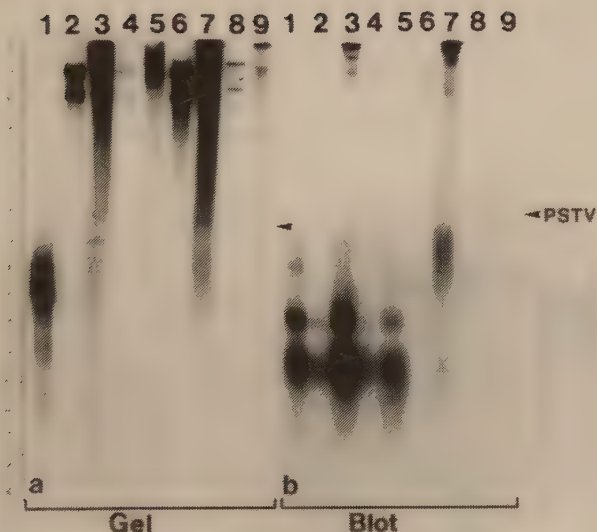


Abbildung 3a und b:

Autoradiogramm eines 1,5% Agarosegels mit 6M Harnstoff und des entsprechenden Nitrocellulose-"Blots" nach Kapillar-"Blotting" (P.THOMAS, 1977) ohne (Abb. 3a und b) und mit NaOH-Behandlung des Gels (Abb. 3c und d) vor dem Transfer. In Abb. 3a und b enthalten die Bahnen radioaktiv markierte Nukleinsäureextrakte aus gesunden und PSTV-infizierten Tomatenzellen:

Bahn 1: LiCl-lösliche RNA aus gesunden Tomaten (offensichtlich kamen kurz vor der Trennung RNasen zur Wirkung!), Bahn 2: wie 1, aber 1:10 verdünnt (offensichtlich RNase-frei!), Bahn 3: LiCl-lösliche RNA aus PSTV-infizierten Tomatenzellen, Bahn 4: wie 3, aber 1:10 verdünnt, Bahn 5: ribosomale RNA aus gesunden Tomatenzellen, Bahn 6: wie 5, aber 1:10 verdünnt, Bahn 7: ribosomale RNA aus PSTV-infizierten Tomaten, Bahn 8: wie 7, aber 1:10 verdünnt, Bahn 9: ^{125}J -PSTV.

(Abbildung 3a und b, Fortsetzung)

Der Vergleich von Gel und "Blot" zeigt, daß im niedermolekularen Bereich (kleiner als PSTV) der Transfer relativ vollständig erfolgt, während im höhermolekularen (größer als PSTV) die Transfereffizienz ausgesprochen niedriger ist.

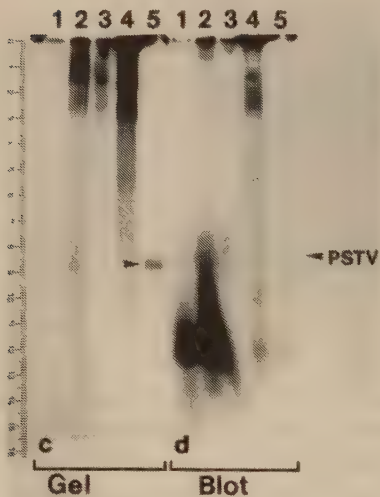


Abbildung 3c und d:

Gel und "Blot" zeigen nur unverdünnte Proben, das Gel wurde vor dem Transfer mit NaOH behandelt:

Bahn 1: LiCl-lösliche RNA aus gesunden Tomatenzellen, Bahn 2: LiCl-lösliche RNA aus PSTV-infizierten Tomaten, Bahn 3: ribosomale RNA aus gesunden Tomaten, Bahn 4: ribosomale RNA aus PSTV-

infizierten Tomaten und Bahn 5: ^{125}J -PSTV.

Der Vergleich von Gel und "Blot" zeigt, daß selbst die NaOH-Behandlung die Transferrate im hochmolekularen Bereich nicht wesentlich verbessert.

3.1.3.3. Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose und "Gene Screen Transfer (GST) Membrane" durch "Elektro-Blotting"

Für diese Versuche wurde ^{125}J -markiertes PSTV in 1,5% Agarose-Gelen in Anlehnung an die Methoden von STELLWAG und DAHLBEG (1980) und BITTNER et al. (1980) im Elektro-"Blot"-Verfahren vom Gel auf die Membran transferiert, d.h. Gel und Transfer Membran wurden dicht aneinandergepackt und senkrecht zu diesem "Sandwich" ein elektrisches Feld angelegt, mit der Anode auf der Seite der Transfermembran. Transferpuffer war ein 25mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5.

Abb. 4 zeigt, daß Nukleinsäuren im Größenbereich von PSTV durch "Elektro-Blotting" wesentlich effizienter auf Transfer-Membranen übertragen werden als durch Kapillar-"Blotting". Die Intensität der radioaktiven Banden auf dem "Blot" ist wesentlich höher als die der im Gel verbliebenen. Die Konzentrationsreihe zeigt, daß 125pg PSTV noch leicht durch Autoradiographie nachzuweisen sind, das entspricht etwa 20 cpm.

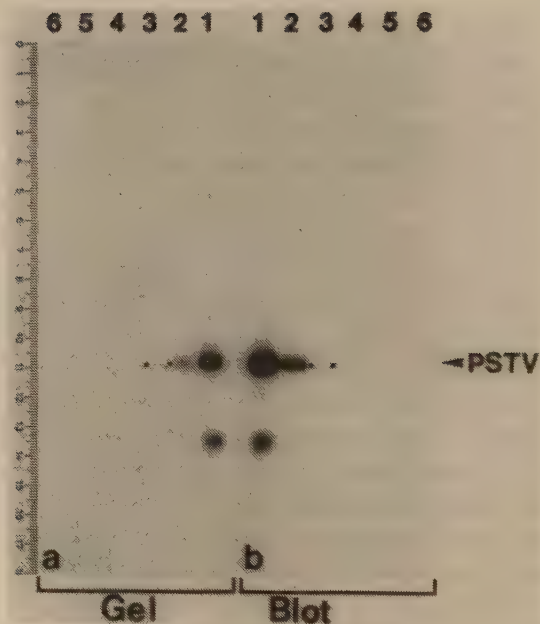


Abbildung 4:

Autoradiogramm eines 1,5% Agarosegels mit 6M Harnstoff und "Gene Sreen-Blots" nach dem Elektrotransfer. Die Bahnen enthalten verschiedene Mengen ^{125}J -PSTV. Bahn 1: 12,5ng, Bahn 2: 1,25ng, Bahn 3: 125pg, Bahn 4: 12,5pg und Bahn 5: 1,25pg jeweils mit einer spezifischen Aktivität von $1,6 \times 10^6 \text{cpm}/\mu\text{g}$. Die letzten sichtbaren Banden sind mit Punkten markiert.

Der Vergleich mit Abbildung 3 zeigt, daß bei diesem Verfahren Nukleinsäuren im Größenbereich des PSTV wesentlich effizienter übertragen werden (mehr als 50% Transferrate) als beim klassischen Kapillar-"Blotting".

Allerdings kann beim "Elektro-Blotting" nur die GST-Membran verwendet werden, da Nitrocellulosefilter unter diesen Bedingungen RNA nicht binden.

Wurde nämlich Nitrocellulose als Transfermembran verwendet, so war nach dem "Blot"-Vorgang zwar keine RNA mehr im Gel nachweisbar, aber auch keine auf der Nitrocellulose (Abb. 5).

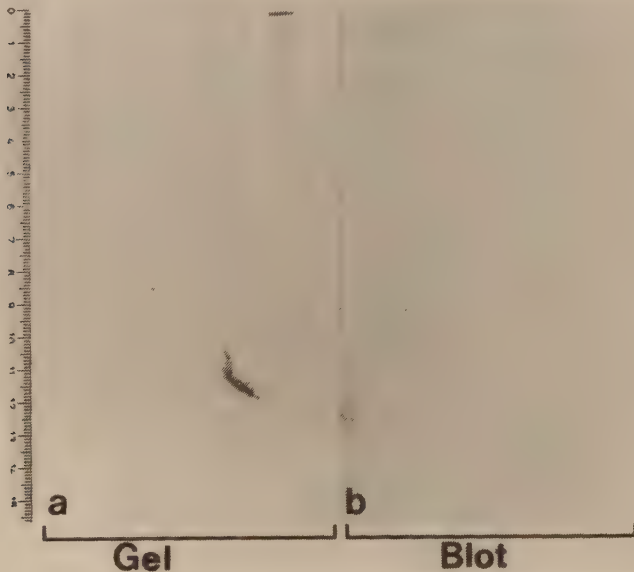


Abbildung 5:

Autoradiogramm eines 1,5% Agarosegels mit 6M Harnstoff und des entsprechenden Nitrocellulose-"Blots" nach dem Elektrottransfer. Weder im Gel noch auf dem "Blot" sind die radioaktiv markierten Nukleinsäureproben nachweisbar, sie werden zwar dem Gel entzogen, jedoch nicht an die Nitrocellulose gebunden.

Bei der GST-Membran handelt es sich um eine zweischichtige Membran, deren Zusammensetzung vom Hersteller (New England Nuclear) nicht bekanntgegeben wird. Offensichtlich ist diese Doppelschichtigkeit eine essentielle Eigenschaft, da die Nukleinsäuren nach dem Elektrotransfer auf der Membran gebunden sind (Abb. 4), während sie von der einschichtigen Nitrocellulose nicht gebunden werden (Abb. 5).

Die Transfer-Effektivität hängt aber auch bei dieser Methode stark von der Größe der Nukleinsäuren ab, kürzerkettigen Moleküle werden besser übertragen als längere. Selbst ein 5%iges Polyacrylamidgel enthält nach dem Transfer fast keine niedermolekulare RNA mehr, wie durch Silberfärbung der verbliebenen RNA Banden im Gel gezeigt werden konnte (Abb. 6).

Ab einer Kettenlänge von etwa 400 Nukleotiden wird der Transfer drastisch schwächer und im hochmolekularen Bereich liegt die Effizienz nur noch bei etwa 50%.

Insgesamt ist der Transfer vollständiger als bei der klassischen Methode des Kapillar-"Blottings", bei der RNA oberhalb 200 Nukleotiden Kettenlänge nicht mehr ausreichend übertragen wurde.

In allen weiteren Versuchen zur Analyse der nukleären RNA wurden folglich die Nukleinsäuren durch Elektro-"Blotting" auf GST-Membran übertragen.

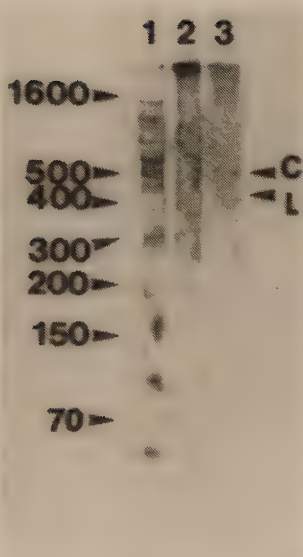


Abbildung 6:

5% Polyacrylamidgel mit glyoxalierten Proben nach Elektrottransfer, silbergefärbt. Bahn 1 enthält Nukleinsäureextrakte aus isolierten Zellkernen von gesunden Kartoffelzellen, Bahn 2 aus Zellkernen von PSTV-infizierten Kartoffelzellen, Bahn 3 partiell gereinigtes PSTV als Marker.

Man kann erkennen, daß nach dem Elektrottransfer noch hochmolekulare Nukleinsäuren im Gel verblieben sind, auch zirkuläres PSTV läßt sich noch nachweisen, lineares PSTV und

niedermolekulare Nukleinsäuren sind fast vollständig transferiert.

3.1.3.4. Hybridisierung von ^{125}J -PSTV gegen PSTV und sRNA auf DBM-Papier nach ALWINE et al. (1977)

Die Hybridisierung der auf DBM-Papier gebundenen RNA mit ^{125}J -PSTV als radioaktiver Probe bei 42°C ergab nach dem Waschen Signale auf der Höhe des in der RNA-Mischung enthaltenen PSTV. Mit der sRNA erfolgte keine Hybridisierung, auch der Hintergrund zeigte keine unspezifischen Bindungen (Abb. 7). Diese Methode erlaubte also eine eindeutige Identifizierung des PSTV. Konzentrationsunterschiede im Bereich einer Zehnerpotenz (vergl. Bahn 2 und 3) ergaben allerdings keinen deutlichen Intensitätsunterschied der Banden. Damit sind quantitative Aussagen auf der Basis von Hybridisierung nur in begrenztem Maße möglich. Diese von ALWINE et al. (1977) beschriebene

Methode hat allerdings einige Nachteile gegenüber den anderen, weiter unten angeführten Verfahren:

1. Es besteht die Gefahr, daß die Papiere aus verschiedenen Chargen von unterschiedlicher Qualität sind, was die Reproduzierbarkeit der Versuche gefährdet.

2. Das ABM-Papier, das die lagerfähige Form ist, muß jedesmal vor dem Transfer diazotiert werden und deshalb muß

3. der Zeitverlauf der Diazotierung und der Gelvorbereitung exakt aufeinander abgestimmt werden.

Diese Nachteile werden nicht durch irgendwelche besonderen Vorteile ausgeglichen, so daß diese Methode im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr zur Anwendung kam.

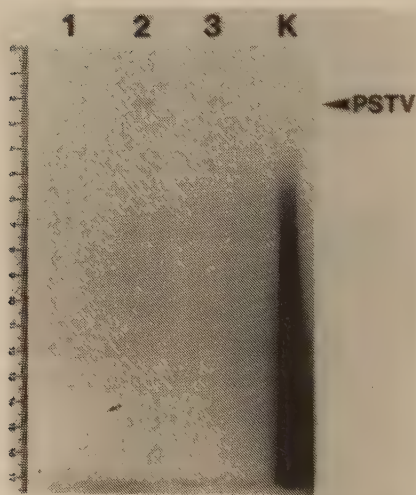


Abbildung 7:

Autoradiogramm eines "Northern Blots" auf DBM-Papier von einem 5% Polyacrylamidgel mit 8M Harnstoff in TEB (vergl. Abb. 2) nach der Hybridisierung mit ^{125}J -PSTV bei 42°C . Als Proben wurden Aliquots verschiedener Mischungen von PSTV und LiCl-löslicher RNA (sRNA) aus gesunden Kartoffelzellen getrennt und "geblottet": Bahn 1: PSTV:sRNA=1:5, Bahn 2:

1:1 und Bahn 3: 1:10. Bahn K enthält radioaktive Zellkern

(Abbildung 7, Fortsetzung)

RNA, mit der die Transfereffektivität kontrolliert werden konnte.

Die Hybridisierung bei 42°C zeigt nur mit RNA-Banden im Bereich des PSTV schwache Signale, die ebenfalls aufgetrennte sRNA wird nicht erfaßt.

3.1.3.5. Hybridisierung von ^{125}J -PSTV gegen PSTV und RNA aus Kartoffelzellen auf GST-Membran

Für die Hybridisierung von ^{125}J -PSTV mit der Membran-gebundenen RNA wurde die von New England Nuclear (NEN) entwickelte "Methode II" ("Gene Screen" Manual) angewandt. Der Hybridisierungspuffer ist ähnlich dem, den P.THOMAS (1977) in ihrer Methode für Transfermembranen aus Nitrocellulose beschreibt (siehe Methoden Kap. 5.11.2.). Der DNA-Gehalt des Hybridisierungspuffers konnte sogar auf 65 µg ssDNA/ml Puffer gesenkt werden, ohne daß eine unspezifische Bindung von Radioaktivität an die Membran erfolgte. Dieses Verfahren führte, verglichen mit den anderen Methoden, zu dem besten Ergebnis (Abb. 8). Es traten kaum unspezifische Signale auf dem Hintergrund auf, die "Blots" enthielten nur spezifisch gebundene Radioaktivität (Abb. 8, Bahn 3) und die gesunden Kontrollen ergaben keinerlei Hybridisierung (Abb. 8, Bahn 1). Ein besonderer Vorteil liegt in der leichten Handhabbarkeit der GST-Membran, die im Gegensatz zu der herkömmlichen Nitrocellulose auch nach dem "Backen" ihre Flexibilität behält und dadurch nicht so leicht einreißt oder zerbricht.

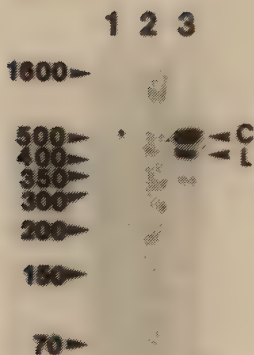


Abbildung 8:

Autoradiogramm eines "Gene Sreen"- "Blots" von einem 5% Polyacrylamidgel mit glyoxalierten Proben nach der Hybridisierung bei 42°C. Bahn 1 enthält RNA aus isolierten Zellkernen von gesunden Kartoffelzellen, Bahn 2 aus Zellkernen von PSTV-infizierten Kartoffelzellen und Bahn 3 partiell gereinigtes PSTV als Marker.

Resümee:

Diese Vergleichs- und Optimierungs-Versuche führten zu folgendem Standardverfahren des Nukleinsäuretransfers und der molekularen Hybridisierung, das für eine routinemäßige Analyse der RNA aus PSTV-infizierten Kartoffelzellkernen eingesetzt wurde: Die nach Glyoxalierung vollständig denaturierte RNA wurde in 3.5%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, durch "Elektro-Blotting" auf GST-Membran übertragen und mit ^{125}J -PSTV als Probe hybridisiert.

3.2. Isolation von Zellkernen aus Kartoffelzellen

3.2.1. Zellkernisolation nach der Original-Methode von WILLMITZER und WAGNER (1981)

Als Zellmaterial wurde eine Suspensionskultur von Kartoffelzellen (Solanum demissum) gewählt, die mit dem Viroid der Kartoffelspindelknollensucht (PSTV) infiziert waren. Diese Zellen vermehren sich rasch und synthetisieren ständig PSTV, das in gut nachweisbaren Mengen akkumuliert wird (MÜHLBACH et al., 1983). Die Zellen wurden alle 7 Tage mit einem Volumen frischem Kulturmedium verdünnt und verdoppelten sich in diesem Zeitraum.

Der Vorteil dieser Suspensionskulturen liegt darin, daß über Jahre hinweg immer vergleichbares Ausgangsmaterial verfügbar ist, das sich durch eine intensive Viroidreplikation auszeichnet. Da unter den gegebenen Wachstumsbedingungen keine Chloroplasten ausgebildet werden, war keine Detergensbehandlung zur Lyse derselben mehr nötig. Dadurch konnte die Kernisolation wesentlich schonender durchgeführt werden.

Für die Isolation der Kerne aus diesen suspendierten Zellen wurde ein Verfahren gewählt, das von WILLMITZER und WAGNER (1981) ursprünglich für die Isolation von Zellkernen aus Tabaksuspensionkulturen entwickelt worden war. Diese Methode wurde zunächst ohne irgendwelche Veränderungen für die Kernisolation aus Kartoffelsuspensionszellen angewandt. Dabei werden die Kartoffelzellen zunächst in einem Puffer mit 0,7M Mannit inkubiert, um sie zu plasmolysieren und die Zellmembran von der Zellwand zu lösen. Dadurch werden bei der anschließenden Behandlung der Zellwände mit 0,01% Cellulase und 0,005% Pectinase nur die Zellwände angegriffen, während die Zellmembran geschont wird. Nach 30 min Enzymbehandlung sind die Zellwände soweit angedaut, daß die Zellen gut homogenisiert werden können. Um die Aktivität der dadurch frei werdenden Enzyme zu reduzieren, werden dieser und alle weiteren Schritte

bei 0-4°C durchgeführt. Durch die Filtration durch Siebtücher mit 130, 80 und 20µm Porenweite wird das homogenisierte Material bereits weitgehend von nicht zerstörten Zellen und größeren Zellbruchstücken getrennt. Die weitere Reinigung geschieht im wesentlichen durch zwei Dichteextrifugationsschritte. Die Dichte der Puffer wird nicht mit den früher üblichen, osmotisch aktiven Zuckern Saccharose bzw. Sorbit (KUEHL, 1964; TAUTVIDAS, 1971; MASKARENHAS et al., 1974; APP und GRANADOS, 1974; CHEN et al., 1975; MENNES et al., 1977; OHYAMA et al., 1977; MENNES et al., 1978; GROBMANN et al., 1979; GUILFOYLE, 1980) sondern mit Percoll eingestellt, einem mit Polyvinylpyrrolidon beschichtetem Silicasol, das gegenüber den Kernen vollkommen inert ist. Im ersten Schritt (42,5% Percoll) werden die Kerne vom Zellbruch befreit, der dabei im Überstand bleibt. Die Kerne sedimentieren zusammen mit der Stärke. Diese wird im zweiten Schritt (88% Percoll) von den Kernen abgetrennt, da sie wieder sedimentiert, während die Kerne als schwimmende Schicht auf dem Puffer "flotieren".

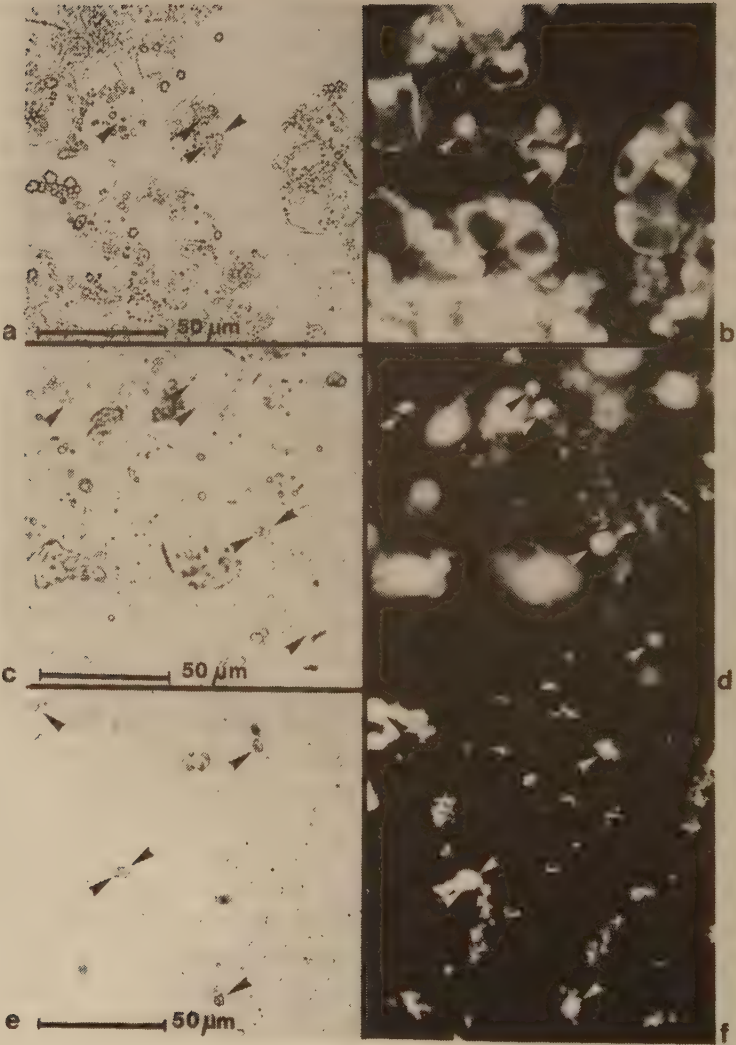
Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Zusammensetzung des Isolationspuffers. Anstelle von divalenten Kationen, die bis dahin zur Stabilisierung nukleärer Strukturen eingesetzt wurden, enthält er Spermin und Spermidin, welche die gleiche Funktion erfüllen. Dadurch kann jedoch dem Puffer EDTA zugesetzt werden, das die aus den Zellen frei werdenden divalenten Kationen komplexiert und damit die Aktivität kationabhängiger Enzyme für den Zeitraum der Isolation hemmt. Außerdem wird die Aggregation der Zellkerne reduziert.

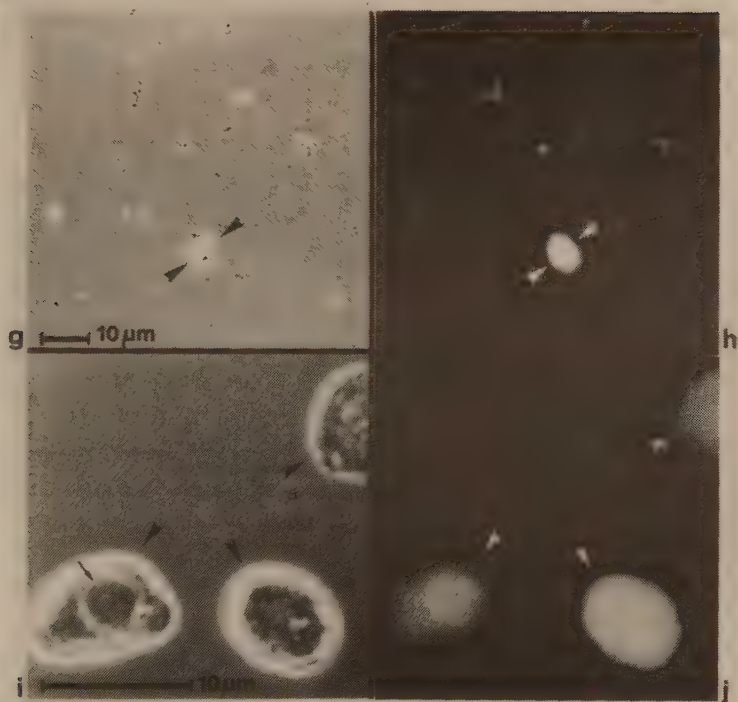
Entsprechend der Vorschrift wurde anstelle einer kurzen Triton X 100-Behandlung dem Isolationspuffer permanent das etwas mildere Detergens Nonidet P 40 beigegeben. Seine ständige Anwesenheit verhindert ebenfalls die Aggregation der Kerne. Die mit diesem Verfahren erhaltenen Kerne waren nach phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopischer Beurteilung frei von jeglichen cytoplasmatischen

Bestandteilen und lagen als einzelne runde bis längliche Organellen vor (Bildtafel 1, i und j).

Mit diesem Verfahren erhält man aus ca. 100g Zellmaterial (Feuchtgewicht) im Durchschnitt $1-2 \times 10^8$ Kerne. Die Struktur der mit dieser Methode isolierten Zellkerne ist gut zu erkennen. Am auffallendsten ist der für solche embryonalen Zellen charakteristische große Nukleolus (Bildtafel 1 i, Pfeil). Die Kerne aus der Suspensionskultur sind insgesamt etwas größer als die aus grünen Pflanzen (SCHUMACHER, 1983), sie erreichen durchschnittlich einen Durchmesser in der Längsachse von 8-10µm. Wurden die Kerne mit Ethidiumbromid gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet, so zeigten sie ein intensives rotes Leuchten, welches durch das in die Nukleinsäuren eingelagerte Ethidiumbromid verursacht wurde (Bildtafel 1).

Bildtafel 1:





Bildtafel 1:

Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellbestandteile, die man bei den verschiedenen Stufen der Kernisolation aus Kartoffelzellen erhält.

a und b: Zellen, die als Ausgangsmaterial eingesetzt wurden, c und d: Zellhomogenat vor der Filtration, e und f: Zellhomogenat nach der Filtration durch 130µm, 80 µm und 20µm Siebtücher, g und h: in 42,5% Percoll-Puffer vom Zellbruch gereinigte rohe Kernfraktion und i und j: durch den 88% Percoll-Puffer hochgereinigten Kerne.

3.2.2. Untersuchung der in gereinigten Kernen enthaltenen RNA

Neben der Analyse ihrer biologischen Aktivität (vgl. Kap.3.3.2.) war es zur Charakterisierung der Zellkerne wichtig festzustellen, welche Arten Nukleinsäuren außer der DNA in ihnen enthalten sind. Vor allem sollte geprüft werden, ob das in den Zellkernen vermutete PSTV durch gelelektrophoretische Analyse nachgewiesen werden kann. Dazu wurden die isolierten Kerne phenolextrahiert und ihre Nukleinsäuren gelelektrophoretisch aufgetrennt (5% Polyacrylamid, 8M Harnstoff, TEB, 70°C) und mit Ethidiumbromid angefärbt (Abb. 9).

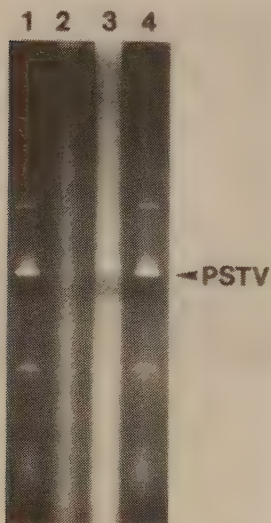


Abbildung 9:

Vergleich der Nukleinsäuren aus isolierten Zellkernen von PSTV-infizierten Kartoffelzellen nach der Trennung in einem 5% Polyacrylamidgel mit 8M Harnstoff und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid. Bahn 1 und 4 enthalten partiell gereinigtes PSTV als Marker, Bahn 3 das RNA-Äquivalent von 1×10^6 Kernen, Bahn 4 das von 5×10^6 Kernen, die nach der Methode von WILLMITZER und WAGNER (1981) isoliert wurden. In den

so erhaltenen Zellkernen läßt sich das PSTV nicht nachweisen.

Das Ergebnis war enttäuschend, denn die Nukleinsäureprobe aus den gereinigten Kernen infizierter Zellen (Abb. 9, Bahn 3 und 4) zeigte über einem verschwommenen Hintergrund nur schwache Banden und die PSTV-Bande war nicht eindeutig zu erkennen, was nach der Trennung von Nukleinsäureex-

trakten aus intakten Zellen keinerlei Probleme bereitet (MÜHLBACH und SÄNGER, 1981; MÜHLBACH et al., 1983).

Daraufhin wurde der Nukleinsäuregehalt aller Fraktionen geprüft, die während der Isolation anfallen.

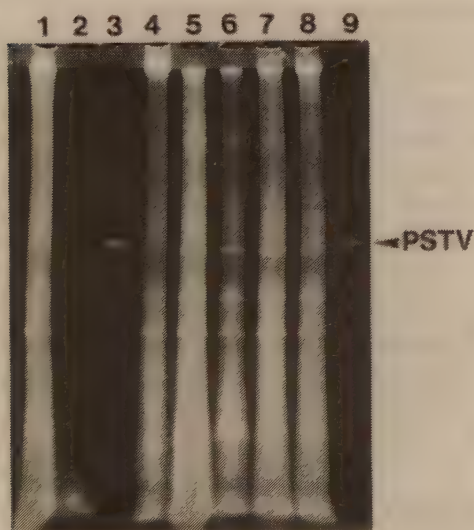


Abbildung 10:

Vergleich der RNA-Muster der Fraktionen, die während der Kernisolation anfallen, nach der Auftrennung auf einem 5% Polyacrylamidgel mit 8M Harnstoff und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Bahn 1 und 2 enthalten den cytoplasmatischen Überstand, der nach der 2000g-

Zentrifugation des filtrierten Homogenats anfällt und durch eine anschließende 30000g-Zentrifugation fraktioniert wurde: Bahn 1: 30000g-Niederschlag, Bahn 2 den 30000g-Überstand. Bahn 3 und Bahn 9 enthalten gereinigtes PSTV als Marker, Bahn 4 enthält RNA aus der gereinigten Kernfraktion (schwimmende Kernlage im 88% Percoll-Puffer), Bahn 5 : RNA aus dem Überstand nach der Zentrifugation im 42,5% Percoll-Puffer (enthält kleine Zelltrümmer und defekte Zellkerne), Bahn 6 : RNA aus dem Überstand des anschließenden Waschschrittes mit Isolationspuffer (enthält Zelltrümmer und defekte Zellkerne), Bahn 7: RNA aus der Interphase zwischen der schwimmenden Kernlage und dem

(Abb. 10, Fortsetzung)

Niederschlag nach der Zentrifugation im 88% Percoll-Puffer (enthält Zelltrümmer und defekte Zellkerne) und Bahn 8: RNA aus dem Niederschlag im 88% Percoll-Puffer (aggregierte Zellkerne und Stärke).

Da mit Ausnahme der gereinigten Kernfraktion (Abb. 10, Bahn 4) alle anderen Fraktionen deutliche RNA Banden enthalten (Abb. 10, Bahnen 5-8) und die verschmierte Bahn und das völlige Fehlen von Banden in der Kernfraktion auf Nuklease-Abbau hindeuten, kann man annehmen, daß die Zellkerne offensichtlich während ihrer Reinigung einen Großteil ihrer RNA verlieren und/oder daß diese durch in den Kernen vorhandene RNasen abgebaut werden. Das Isolationsverfahren mußte also so modifiziert werden, daß die Kerne ihre RNA auch nach der Reinigung noch möglichst vollständig enthalten.

3.2.3. Modifikation der Zellkernisolation

3.2.3.1. Verkürzung des Verfahrens

Zunächst wurde versucht, das vermutete "Ausbluten" der Kerne durch Verkürzung der Isolationdauer zu reduzieren. Dazu wurde zuerst die Menge des Ausgangsmaterials auf 1/5 verringert, d.h. von 500g auf 100g Feuchtgewicht, wodurch sowohl die Dauer der Filtration, als auch die Zeit zum Resuspendieren der Sedimente erheblich verkürzt wurde. Dadurch wurde etwas mehr als eine Stunde gewonnen, alle weiteren Isolationen wurden folglich mit 100g Ausgangsmaterial durchgeführt.

Der Versuch, die beiden Percoll-Zentrifugations-schritte durch Übereinanderschichten der beiden unterschiedlich dichten Percoll-Puffer in einem Schritt zu vereinigen, scheiterte, da sich die Kerne nicht, wie er-

wartet, als Interphase zwischen dem unteren, dichteren und dem oberen, weniger dichten Puffer ansammelten, sondern flockig über einen weiten Bereich verteilt waren. Die beiden Zentrifugationsschritte mußten also weiterhin getrennt durchgeführt werden. Die gelelektrophoretische Analyse der RNA aus den in kürzerer Zeit isolierten Kernen zeigte allerdings, daß die Verkürzung des Verfahrens alleine noch nicht den gewünschten Erfolg brachte, denn es traten noch immer keine definierten Banden auf. Es mußten daher weitere Parameter variiert werden. Die reduzierte Ausgangsmenge wurde jedoch aus arbeitstechnischen Gründen beibehalten.

3.2.3.2. Modifikation der Detergens-Konzentration

Es wurde angenommen, daß die Kernmembran durch die relativ hohe Konzentration (0,6%) des Detergens Nonidet P 40 (NP 40) so sehr geschädigt wurde, daß die nukleäre RNA austreten konnte. Daraufhin wurden folgende Konzentrationen von NP 40 getestet: 0; 0,12; 0,24; 0,36; 0,48 und 0,6%.

Mit höheren Detergenskonzentrationen stieg die Zahl der ausgezählten freien Kerne stark an (Abb. 11), was vor allem darauf beruhte, daß die Kerne weniger stark aggregierten. Allerdings wurden die Nukleinsäure-Muster auf den Gelen deutlich schlechter. Da jedoch schon bei 0,24% NP 40 eine zufriedenstellende Kernaussbeute erreicht werden konnte und gleichzeitig eine Verbesserung der Qualität der RNA Banden im Größenbereich des PSTV zu beobachten war (Abb. 12), wurde als Kompromiß für den Homogenisations-schritt die ursprüngliche Konzentration von 0,6% NP 40 beibehalten. In allen weiteren Schritten wurde jedoch die für die Qualität der Nukleinsäuren optimale Konzentration von 0,24% verwendet.

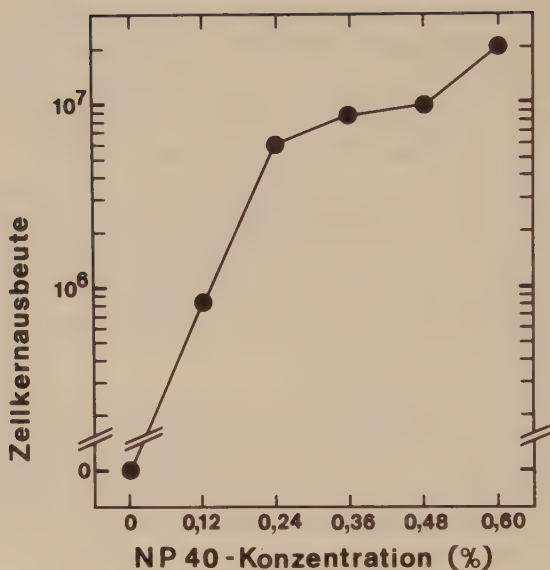


Abbildung 11:

Abhängigkeit der Zellkernausbeute von der Detergensenkonzentration. Ordinate: Zahl der isolierten freien Zellkerne im logarithmischen Maßstab, Abszisse: eingesetzte NP 40-Konzentrationen.

Die Kernaussbeute steigt bis zu einer Konzentration von 0,24% NP 40 steil an, eine weitere Erhöhung der Detergensenkonzentration verbessert die Ausbeute nur noch unwesentlich. 0,24% NP 40 ist somit die optimale Konzentration.

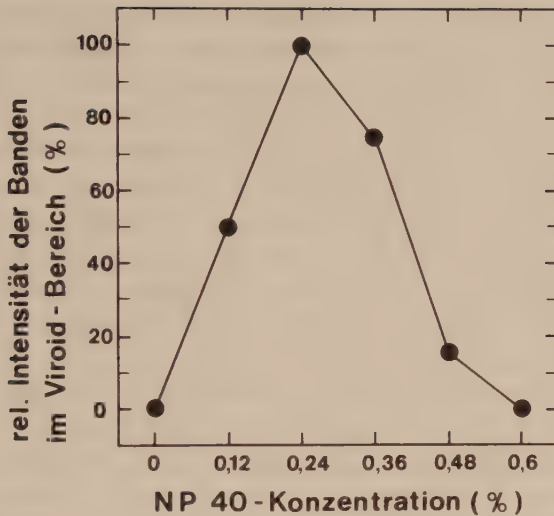


Abbildung 12:

Abhängigkeit der Intensität der Banden im Viroidbereich von der Konzentration des Detergens NP 40 im Isolationspuffer. Ordinate: relative Intensität der Banden in Prozent, wobei die stärkste Bande als 100% definiert wurde. Abszisse: eingesetzte NP 40-Konzentrationen.

Die Intensität der Banden hat ihr Maximum bei 0,24% NP 40.

3.2.3.3. Modifikation der Konzentration von Spermin und Spermidin

Um die Kernmembran zu stabilisieren, enthält der Isolationspuffer 0,15mM Spermin und 0,5mM Spermidin. Es wurde daher getestet, ob eine Erhöhung der Konzentration dieser Komponenten den stabilisierenden Effekt verstärkt. Dabei erwies sich die Unverträglichkeit von Percoll mit höheren Konzentrationen dieser Komponenten als limitierender Faktor, da es zu Komplexbildung und Ausflockung im Puffer kam.

Die optimale Konzentration von Spermin und Spermidin wurde experimentell mit folgender Strategie ermittelt: Verschiedene Konzentrationen von Spermin und Spermidin wurden jeweils mit der im ursprünglichen Rezept angegebenen Konzentration von 0,5mM Sperminidin oder 0,15mM Spermin kombiniert und für die Zellkernisolation eingesetzt. Das Abschätzen der Eignung der verschiedenen Konzentrationen erfolgte über die Bestimmung der Kernaussbeute, die Reinheit der Präparationen und den Nachweis von RNA-Banden im Nukleinsäureextrakt nach gelelektrophoretischer Analyse. Das Gesamtergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

1. Im ersten Experiment wurde die ursprüngliche Spermin-Konzentration mit folgenden Spermidin-Konzentrationen kombiniert: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 15; 20 und 50mM. Dabei flockten die Puffer mit 20 und 50mM Spermidin sofort bei der Mischung mit Percoll aus, die mit 10 und 15mM Spermidin beim Einstellen des pH-Wertes. Diese hohen Konzentrationen erwiesen sich somit als nicht brauchbar. Die Variation von Spermidin hatte bei den verwendbaren Konzentrationen keinen Einfluß auf die Ausbeute an isolierten Kernen. Ein Unterschied war jedoch bei der RNA-Analyse festzustellen, hier zeigte die Kernpräparation, die mit 5mM Spermidin (Tab.2, 1.Spalte senkrecht) gemacht worden war, deutlich sichtbare Banden im Bereich der Viroid-RNA.

2. Als nächster Schritt wurden die verschiedenen Spermin-Konzentrationen mit der ursprünglichen Spermidin-Konzentration kombiniert, also: 0,5mM Spermidin mit 0,15; 0,3; 0,75 und 1,5mM Spermin (Tab.1, 1.Reihe waagrecht). Dabei ergab die Kernfraktion mit 0,75mM Spermin nach gelelektrophoretischer Analyse der extrahierten Nukleinsäuren die deutlichsten Banden.

Tabelle 2:

Übersicht über die getesteten Spermin- und Spermidin-Konzentrationen im Isolationspuffer:

Spermin (mM)	0,15	0,3	(0,38)	<u>0,75</u>	1,5
Spermidin (mM)					
0,5	+	+	n	++	+
1,0	+	n	n	n	n
(2,5)	+	n	+++	n	n
<u>5,0</u>	++	+	n	-	-
10,0	-	n	n	n	n

Die optimalen Werte (optimale Konzentration der einen Komponente in Kombination mit der ursprünglichen Konzentration der anderen) sind durch Unterstreichen, die halb-optimalen (jeweils der halbe Wert des Optimums, das in Kombination mit der ursprünglichen Konzentration der zweiten Komponente gefunden worden war) durch Einklammern gekennzeichnet.

Die Symbole bedeuten:

- + : Kernisolation prinzipiell möglich, aber RNA-Gehalt unbefriedigend
- ++ : beste Kernpräparation innerhalb einer Serie, bei der eine der beiden getesteten Komponenten in ursprünglicher Konzentration vorlag
- +++ : optimale Kernpräparation und beste Nukleinsäurequalität
- : keine Kernisolation möglich, Auftreten von Präzipitaten bei der Pufferherstellung oder Aggregation der Kerne nach dem Aufnehmen in diesem Puffer
- n : nicht getestet

3. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die im ersten Experiment gefundene beste Spermidin-Konzentration mit verschiedenen Spermin-Konzentrationen getestet, also: 5mM Spermidin mit: 0,15mM (ursprüngliche Konzentration), 0,3; 0,75 und 1,5mM Spermin. Bei den Puffern mit 0,75 und 1,5mM Spermin zeigte sich nach der Zentrifugation, daß auch hier in Kombination mit Percoll vernetzte Strukturen entstanden (vgl. Tab.2, 4.Reihe waagrecht), in denen die Kerne gefangen wurden und nicht mehr isoliert werden konnten. Von den beiden übriggebliebenen Varianten erwies sich 0,15mM Spermin als optimal, die Präparation mit 0,3mM Spermin zeigte nach der gelelektrophoretischen Analyse der Kernextrakte weniger deutliche RNA-Banden. Dieses Optimum ist wieder identisch mit dem Ergebnis des ersten Experiments.

4. Da die beiden unabhängig voneinander ermittelten Optima nicht miteinander kombiniert werden konnten (vergl. Tab.2), wurden in einer dritten Versuchsserie jeweils die halboptimalen Konzentrationen eingesetzt und direkt mit den ursprünglichen Konzentrationen verglichen. Daraus ergaben sich folgende Konzentrationen:

0,15mM Spermin, 0,5mM Spermidin:	ursprüngliche Werte
0,75mM Spermin, 0,5mM Spermidin:	optimierte Spermin-konzentration
0,15mM Spermin, 5,0mM Spermidin:	optimierte Spermidin-konzentration
0,38mM Spermin, 2,5mM Spermidin:	halboptimale Werte

Lichtmikroskopisch ließ sich kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Kernfraktionen feststellen, aber bei der gelelektrophoretischen Analyse der Kernextrakte erhielt man bei der Präparation mit den halboptimalen Konzentrationen die deutlichsten Banden (Abb. 13). Der Vergleich der RNA-Extrakte aus Kernen, die mit dem modifizierten Verfahren isoliert wurden, mit Extrakten aus Kernen, die noch mit dem unveränderten Verfahren gewonnen

worden waren, ergab, daß die Modifikation zu wesentlich besseren Kernpräparaten führt. (vergl. Abb. 10; Bahn 4 und Abb. 13).

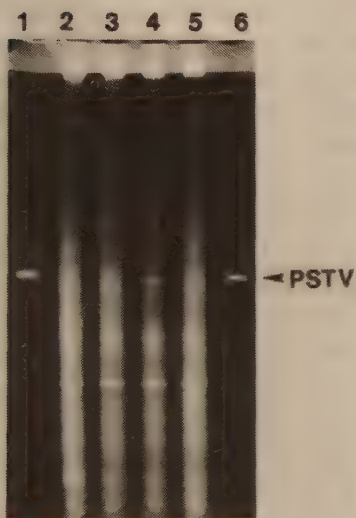


Abbildung 13:

Vergleich der Bandenintensität im Viroidbereich von RNA aus Zellkernen bei deren Isolation Isolationspuffer verschiedener Spermin- und Spermidinkonzentration verwendet wurden. Die Bahnen 1 und 6 enthalten gereinigtes PSTV als Marker, die RNA in den Bahnen 2-5 wurde aus Kernen extrahiert, deren Isolationspuffer folgende Spermin- und Spermidinkonzentrationen enthielten: Bahn 2: 0,75mM Spermin und 0,5mM Spermidin (Spermin optimal), Bahn 3: 0,15mM

Spermin und 5,0mM Spermidin (Spermidin optimal), Bahn 4: 0,15mM Spermin und 0,5mM Spermidin (ursprüngliche Konzentrationen) und Bahn 5: 0,38mM Spermin und 2,5mM Spermidin (halboptimale Konzentrationen). Die Trennung erfolgte in einem 5% Polyacrylamidgel in Gegenwart von 8M Harnstoff, das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt. In Bahn 5 heben sich die Banden im Viroidbereich am klarsten ab, der Isolationspuffer mit den halboptimalen Spermin- und Spermidinkonzentrationen ist somit am geeignetsten.

Als Ergebnis der Optimierungsversuche wurden für alle weiteren Kernisolationen aus Kartoffelzellen, abweichend von der ursprünglichen Vorschrift von WILLMITZER und WAGNER (1981) für Tabakzellen, folgende Modifikation eingeführt:

Anstelle der ursprünglichen 500g Zellmaterial wurden nur noch 100g eingesetzt. Der Isolationspuffer enthielt lediglich für den Homogenisationsschritt die ursprünglichen 0,6% NP 40, während für alle weiteren Schritte die NP 40-Konzentration auf 0,24% reduziert wurde. Hingegen die Spermin-Konzentration wurde von 0,15mM auf 0,38mM und die Spermidin-Konzentration von 0,5mM auf 2,5mM erhöht.

3.3. Biochemische Charakterisierung der Zellkerne, die nach der modifizierten Methode isoliert worden waren

3.3.1. Vergleich der RNA-Muster von gesunden und infizierten Zellkernen

Zur detaillierten Analyse der RNA aus Kartoffelzellkernen wurden RNA-Extrakte aus isolierten Zellkernen von gesunden und PSTV-infizierten Kartoffelzellen gelelektrophoretisch auf 3,5%igen Polyacrylamidgelen nach vollständiger Denaturierung mit Glyoxal getrennt. Da die RNA-Konzentrationen der Proben sehr gering war, wurde ihnen für die Alkoholpräzipitation tRNA als Carrier zugesetzt. Partiiell gereinigtes PSTV diente als Kontrollprobe. Die RNA wurde mit Hilfe der Silberfärbung nach der Methode von GOLDMAN und MERRIL (1982) sichtbar gemacht. Abb. 14 zeigt, daß in den entsprechenden Zellkernextrakten zahlreiche Banden bis zu einer Größe von etwa 2000 Nukleotiden auf auftreten.

Das Fehlen von dickeren Banden im Bereich der 5S RNA und tRNA ist ein Indiz dafür, daß die Kernpräparationen praktisch frei von cytoplasmatischen Bestandteilen waren. Die Kernproben sowohl aus gesunden als auch aus PSTV-infizierten Zellen (Abb. 14, Bahn 2 und 3) zeigen auf Höhe des PSTV-Markers ein sehr dichtes Bandenmuster. Daher kann keine dieser Banden eindeutig als PSTV identifiziert werden. Infolgedessen läßt sich durch Gelelektrophorese und Silberfärbung allein nicht entscheiden, ob in der RNA aus infizierten Kernen PSTV vorhanden ist (vergl. Kap. 3.4.).

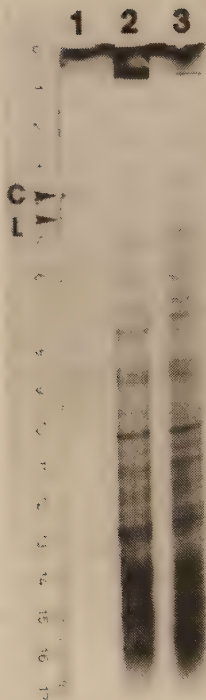


Abbildung 14:

Vergleich glyoxalierter RNA-Proben aus Zellkernen gesunder und PSTV-infizierter Kartoffelzellen, die nach der modifizierten Methode isoliert wurden, auf einem 3,5% Polyacrylamidgel nach Silberfärbung.

Bahn 1: gereinigtes PSTV als Marker, zirkuläres (C) und lineares (L) PSTV werden getrennt. Bahn 2: RNA aus Zellkernen von PSTV-infizierten Kartoffelzellen, Bahn 3: RNA aus Zellkernen von gesunden Kartoffelzellen. Aufgrund der hohen Bandendichte im Viroidbereich lassen sich die PSTV-Banden in der infizierten Probe (Bahn 2) nicht von den anderen unterscheiden.

3.3.2. Messung der RNA-Synthese isolierter Zellkerne

Die biologische Aktivität isolierter Zellkerne wurde durch den Einbau von radioaktiv markiertem UMP in hochmolekulare Produkte bestimmt. Dabei wurde der zeitliche Verlauf der RNA-Synthese über 120 min verfolgt. Zur Charakterisierung der hauptsächlich aktiven RNA-Polymerasen wurde alpha-Amanitin verwendet. Außerdem wurden Zellkerne aus Kartoffelzellsuspensionen verglichen mit Zellkernen, die aus Kartoffelkalluskulturen isoliert worden waren.

3.3.2.1 RNA-Synthese in Zellkernen aus Kartoffelsuspensionen

Die ^3H -UMP-Einbaurrate der isolierten Kerne über einen Zeitraum von 120 min ist in Abb.15 dargestellt. Sie ist vergleichbar mit der von Kernen aus einer Tabaksuspensionskultur (WILLMITZER und WAGNER, 1981).

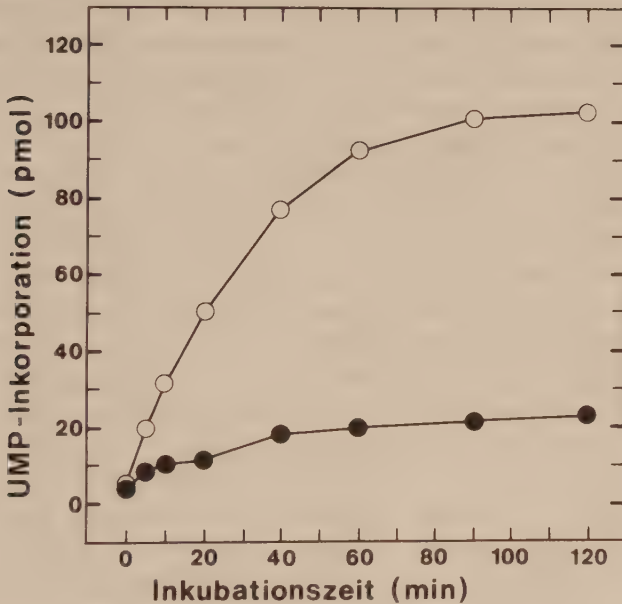


Abbildung 15:

Zeitverlauf der in vitro UMP-Inkorporation von 10^6 isolierten Zellkernen aus Kartoffelsuspensionszellen.

○: Verlauf des UMP-Einbaus

●: Verlauf des UMP-Einbaus in einem Ansatz mit 10^{-6}M α -Amanitin

Nach 90 min haben 10^6 Kerne etwa 100 pmol UMP inkorporiert.

Die UMP-Einbaurrate steigt innerhalb der ersten 20 min linear an, verlangsamt sich dann und geht allmählich in eine Plateau-Phase über, die bei ca. 90 min erreicht wird. Innerhalb von 90 min werden etwa 100pmol UMP pro 10^6 Kerne eingebaut. Der Zusatz von $2\mu\text{g/ml}$ alpha-Amanitin reduziert die Aktivität auf 10-20%. Daraus kann geschlossen werden, daß der Hauptanteil der RNA-Synthese auf die alpha-Amanitin-sensitive DNA-abhängige RNA-Polymerase II (pol II) zurückzuführen ist, die, ebenso wie die beiden anderen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen I und III (pol I, pol III), im Zellkern lokalisiert ist.

Diese drei Polymerasen lassen sich in vitro gut durch ihre unterschiedliche alpha-Amanitin-Sensitivität unterscheiden:

pol I ist alpha-Amanitin-resistent, pol II bei 10^{-6}M alpha-Amanitin zu etwa 95% und pol III zu etwa 40% gehemmt (JENDRISAK, 1980). Bei dieser Konzentration des Hemmstoffs muß demnach der verbleibende Einbau von ^3H -UMP fast vollständig auf pol I- und die noch verbleibenden 60% der pol III-Aktivität zurückgeführt werden. Diese Zuordnung ist allerdings mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, da diese hemmenden alpha-Amanitin-Konzentrationen mit isolierten Polymerasen in vitro ermittelt worden sind und noch nicht geklärt ist, inwieweit sie sich auf die Hemmung der Polymerasen innerhalb intakter Zellkerne übertragen lassen.

3.3.2.2. Vergleich der Kerne aus Suspensions- und Kalluskulturen

Die optimierte Kernisolationsmethode wurde auch für die Gewinnung von Kernen aus Kalluskulturen angewandt. Kallus- und Suspensionskulturen unterscheiden sich im wesentlichen durch die Größe der Zellkolonien und die Wachstumsgeschwindigkeit. Im Gegensatz zu Suspensionskulturen müssen die Kalluskolonien nur etwa einmal monatlich zerkleinert und auf frisches Medium umgesetzt werden. Sie erreichen in dieser Zeit einen Durchmesser von ca. 1cm.

Da es sich beim Kallus von S. demissum um lockere Zellverbände handelt, die ein weiches Gewebe bilden, war die Kernisolation auch mit diesem Material erfolgreich.

Gravierend war jedoch der Unterschied der UMP-Einbaurates. Im Vergleich zu den Kernen aus der Suspensionskultur erreichten die Kerne aus der Kalluskultur nur etwa 1% der Einbaurates, so daß sich dieses Zellsystem als ungeeignet für weitere Untersuchungen erwies (vergl. Abb. 15 und 16, man beachte den unterschiedlichen Maßstab der Ordinate).

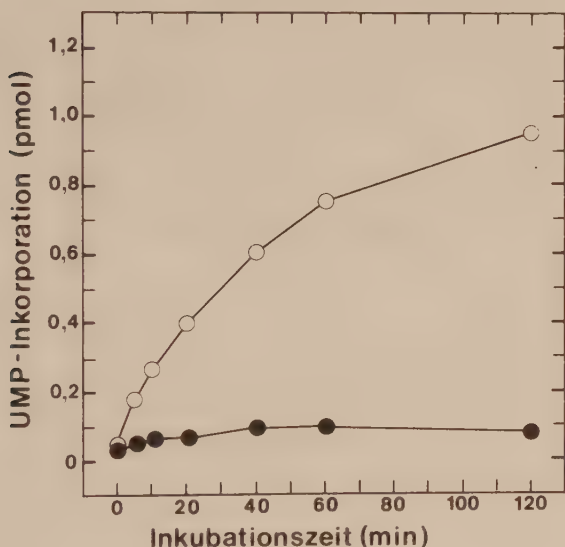


Abbildung 16:

Zeitverlauf der in vitro UMP-Inkorporation von 10^6 isolierten Zellkernen aus Kartoffelkalluszellen.

○ : Verlauf des UMP-Einbaus

● : Verlauf des UMP-Einbaus in einem Ansatz mit $10^{-6}M$ alpha-Amanitin

3.3.2.3. Einfluß des Alters der Zellsuspension auf die Polymeraseaktivität der daraus isolierten Kerne

Die Wachstumskurve einer Kartoffelsuspensionskultur zeigt, daß die Zellen 1-2 Tage nach dem Verdünnen der Kultur mit einem Volumen frischem Kulturmedium in einer "lag"-Phase verharren, etwa am 3.Tag in die log-Phase eintreten, und nach etwa 11 Tagen beginnen das Wachstum zu verlangsamen, um nach 19 Tagen in die stationäre Phase überzugehen (FAUSTMANN, 1982). Sie werden deshalb routinemäßig innerhalb der logarithmischen Phase, d.h. alle 7 Tage, mit frischem Medium verdünnt. Um den Einfluß des Alters der Zellen auf die RNA-Synthese-Aktivität der isolierten Zellkerne zu untersuchen, wurden aus Zellen am 3. und am 7. Tag nach dem Verdünnen Zellkerne isoliert und ihre RNA-Synthese-Aktivität bestimmt (Abb. 17).

Es zeigte sich, daß die Zellkerne 3 Tage nach dem Verdünnen eine sehr hohe Polymeraseaktivität hatten, während sie am 7.Tag, wo sie üblicherweise wieder verdünnt wurden, merklich weniger RNA synthetisierten (Abb. 19). Es wurden daher bei allen weiteren Isolationen 4 Tage alte Kulturen verwendet, da die Zellen sich nach 3 Tagen noch nicht ausreichend vermehrt hatten. Die daraus gewonnenen Kerne konnten in Isolationspuffer mit 50% Glycerin bei -80°C gelagert werden. Sie behielten über 3 Monate Polymerase-Aktivität ohne merkliche Einbuße, nach einem Jahr waren jedoch nur noch etwa 35% der Aktivität erhalten.

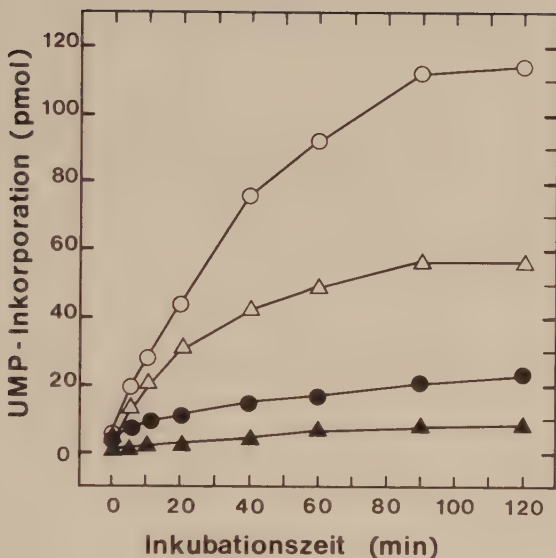


Abbildung 17:

Vergleich der UMP-Inkorporation von 10^6 isolierten Zellkernen, die 3 Tage (○ und ●) und 7 Tage (△ und ▲) nach dem Verdünnen der Suspensionkultur isoliert wurden.

○, △: Verlauf des UMP-Einbaus

●, ▲: Verlauf des UMP-Einbaus in einem Ansatz mit 10^{-6} M alpha-Amanitin

Die Einbaurrate der Zellkerne aus 3 Tage vor der Kernisolation verdünnten Kartoffelzellen ist etwa doppelt so hoch als aus den 7 Tage vorher verdünnten.

3.4. Nachweis von PSTV und PSTV-komplementärer RNA in isolierten Zellkernen durch molekulare Hybridisierung

Infolge der Vielzahl der Banden in silbergefärbten Gelen (vergl. Abb. 14) ist eine eindeutige Identifizierung der PSTV-Bande in Zellkern-RNA aus PSTV-infizierten Zellen nicht möglich. Die einzige Methode, die sich unter diesen Voraussetzungen für einen sicheren PSTV-Nachweis eignet, ist die molekulare Hybridisierung. Dabei wird eine Nukleinsäure einer bestimmten Sequenz mit Hilfe einer dazu exakt komplementären "Probe", die in der Regel radioaktiv markiert ist, nachgewiesen. Die Grundlage dieser Methode ist die spezifische Paarung komplementärer Basen in den verwendeten Nukleinsäuren. Als Hybridisierungsproben werden entweder isolierte DNA-Stücke verwendet, mit deren Hilfe mRNA-Stücke gefunden werden (Northernblot-Hybridisierung) oder isolierte RNA wird verwendet, um die entsprechenden Sequenzen in der genomischen DNA aufzuspüren (Southernblot-Hybridisierung). Heute besteht außerdem die Möglichkeit, klonierte oder chemisch synthetisierte Nukleinsäurestücke (meist DNA) für spezifische Hybridisierungen einzusetzen. Beim PSTV gibt es nun die Möglichkeit, das Viroidmolekül selbst als Hybridisierungsprobe zum Nachweis von PSTV zu verwenden, da die PSTV RNA ein in hohem Grade selbstkomplementäres Molekül ist. Dabei ist nicht nur eine intramolekulare, sondern auch eine intermolekulare Basenpaarung zwischen Molekülen gleicher Polarität erreichbar. PSTV tritt im Verlauf seiner Replikation in zwei Polaritäten auf: der infektiösen PSTV RNA, die vereinbarungsgemäß PSTV(+)RNA genannt wird und der dazu komplementären PSTV RNA, die dementsprechend als PSTV(-)RNA bezeichnet wird. Man kann also mit PSTV(+)RNA als Probe PSTV(+)Sequenzen in einem komplexen Nukleinsäuregemisch nachweisen. Darüberhinaus kann man mit dieser Hybridisierungsprobe natürlich auch PSTV-komplementäre Sequenzen (PSTV(-)RNA) auffinden. Dementsprechend mußten PSTV-spezifische Hybridisierungsbedingungen ausgearbeitet werden, bei denen nur PSTV-

Sequenzen untereinander hybridisieren und stabile Basenpaarungen mit anderen Nukleinsäuren nicht möglich sind.

3.4.1. Ermittlung der optimalen Hybridisierungsbedingungen

Zur Vermeidung unspezifischer Hybridisierung zwischen der radioaktiv markierten PSTV-Probe und zellulären Nukleinsäuren mußten für jede der verschiedenen verwendeten Hybridisierungsproben die optimalen Hybridisierungsbedingungen experimentell ermittelt werden.

Die Spezifität des Nachweises läßt sich durch den Formamidgehalt des Hybridisierungspuffers und die Hybridisierungstemperatur steuern, da die Stabilität der Hybride direkt mit ihrer Schmelztemperatur zusammenhängt, die ihrerseits von der Basenzusammensetzung, insbesondere dem prozentualen Anteil von G und C, und der Kettenlänge der Hybride, der Zahl der darin auftretenden Fehlpaarungen ("Mismatches"), der Ionenstärke des Hybridisierungspuffers und der Konzentration der darin enthaltenen helixdestabilisierenden Komponenten (wie Formamid) abhängt (MEINKOTH und WAHL, 1984). Spezifische Hybridisierungen weisen, im Gegensatz zu unspezifischen, einen hohen Grad an Basenpaarung mit wenigen oder keinen Fehlpaarungen auf und haben infolgedessen einen entsprechend hohen Schmelzpunkt. Durch Erhöhen der Hybridisierungstemperatur und der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer werden also unspezifischen Hybride zuerst zerstört. Die Bedingungen müssen daher so gewählt werden, daß die spezifischen Hybride noch stabil sind, während die unspezifischen Hybride schon nicht mehr beständig sind.

3.4.1.1. ^{125}J -PSTV als Hybridisierungsprobe

Zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur mit ^{125}J -PSTV als radioaktiver Probe wurden Hybridisierungen in Gegenwart von 50% Formamid bei 42°C, 55°C und 70°C durchgeführt (Abb. 18). 42°C ist die Temperatur, die sich als optimale Hybridisierungstemperatur bei Verwendung einzelsträngiger Nukleinsäuren erwiesen hat (ALWINE et al., 1977). 55°C ist die Temperatur, bei der im Falle der PSTV Hybride zwischen identischen Strängen, also zwischen PSTV(+)RNA oder zwischen PSTV(-)RNA-Molekülen, wie auch zwischen komplementären Strängen, also zwischen PSTV(+) und (-)RNA möglich sind (ROHDE und SÄNGER 1981). Bei 70°C sollten nur noch die durch ihre vollständige Komplementarität wesentlich thermostabileren Hybride zwischen Strängen entgegengesetzter Polarität ((+)(-)-Hybride) gebildet werden.

Als Testgemische für den Nachweis von PSTV wurden Nukleinsäureextrakte aus verschiedenen Zellkernaufarbeitungen und gereinigtes PSTV eingesetzt. Die Nukleinsäuren wurden durch Glyoxalierung vollständig denaturiert, auf 3,5% Polyacrylamidgelen getrennt, anschließend auf GST Membran elektrophoretisch übertragen ("Elektro-Blotting") und schließlich dort durch sogenanntes "Backen" bei 80°C im Vakuum fixiert. Nach der Hybridisierung mit ^{125}J -PSTV bei 42°, 55° und 70°C wurden die "Blots" getrocknet und autoradiographiert. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt.

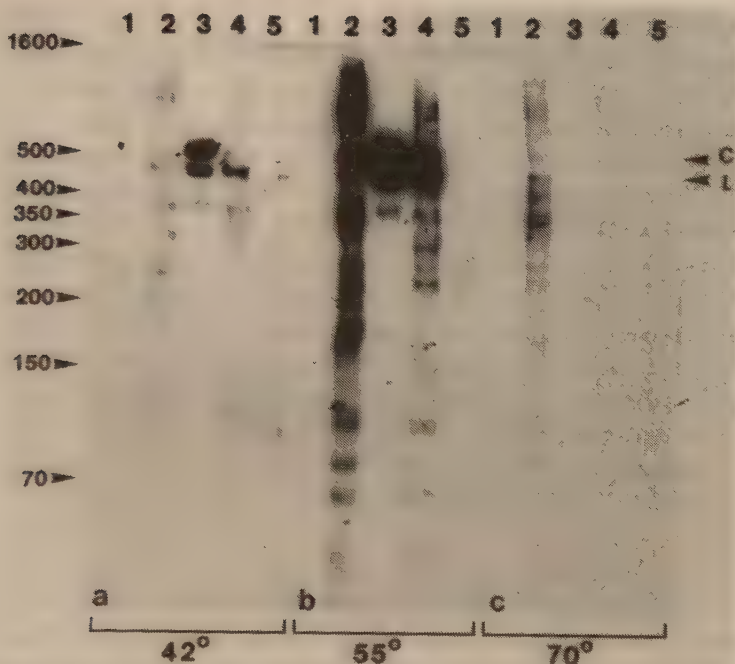


Abbildung 18:

Einfluß der Temperatur während der molekularen Hybridisierung auf den Nachweis von PSTV in "Northernblots". Die glyoxalierten Proben wurden auf 3,5%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt. Nach dem Elektrotransfer der RNA auf GST-Membran und der Fixierung erfolgte die Hybridisierung mit ^{125}J -PSTV bei 42°C (a), 55°C (b) und 70°C (c). Der Nachweis der Hybridisierungssignale erfolgte durch anschließende Autoradiographie.

Auf den einzelnen Bahnen des Gels wurden folgende Proben dreimal in identischer Reihenfolge aufgetrennt:

Bahn 1: RNA-Äquivalent von 1×10^6 Zellkernen aus gesunden Kartoffelzellen, Bahn 2: RNA-Äquivalent von 1×10^6 Zellkernen aus PSTV-infizierten Kartoffelzellen, Bahn 3: 10ng

(Abb. 18, Fortsetzung)

partiell gereinigtes PSTV als Marker, Bahn 4: RNA-Äquivalent von 1×10^6 Zellkernen PSTV-infizierter Kartoffelzellen, die nur durch Filtration und eine 1000g-Zentrifugation isoliert wurden, Bahn 5: RNA des cytoplasmatischen Überstandes, der bei der Isolation der Zellkerne von Bahn 4 anfiel.

Die Zahlen am linken Bildrand geben in etwa die Nukleotidzahl der Kettenlänge der RNA an, die sich nach der Gelelektrophorese in diesen Bereichen befindet.

Das zirkuläre und lineare PSTV befinden sich in dem Bereich zwischen der 400- und 500-Marke.

"C": zirkuläres PSTV

"L": lineares PSTV

Die Tatsache, daß mit allen Kontrollproben aus gesunden Kernen (Bahnen 1) keinerlei Hybridisierung auftritt, während in den PSTV-enhaltenden Proben deutliche Signale erscheinen, beweist, daß bei allen drei Temperaturen eine PSTV-spezifische Hybridisierung vorliegt.

Die stärkste Hybridisierung erfolgte bei 55°C ("Blot" b), bei der alle Hybride zwischen PSTV(+)(+)-, PSTV(-)(-)- und PSTV(+)(-)-RNA stabil sind. Mit dem PSTV-Marker (Bahn 3) treten sehr starke Signale auf, in der Bande des zirkulären Viroids wesentlich stärker als in der des linearen, was mit der schon früher gemachten Beobachtung übereinstimmt, daß isoliertes PSTV im wesentlichen als zirkuläres Molekül vorliegt (SÄNGER et al. 1976).

In den RNA Proben aus infizierten Zellkernen (Bahnen 2 und 4) erscheint jeweils auf der Höhe der beiden PSTV-Marker-Banden eine kräftige Schwärzung des Films. Bei Zellkernen, die nach einem stark verkürzten Verfahren isoliert worden waren (Bahn 4), ist der Anteil an linearem PSTV allerdings größer als der des zirkulären. Zusätzlich treten eine Reihe von PSTV-spezifischen Banden auf, die

größer sind als das zirkuläre Molekül. Auch kleinere PSTV-Sequenzen sind deutlich erkennbar. Im cytoplasmatischen Überstand finden sich keine oder nur geringe Mengen PSTV-spezifischer Sequenzen (Bahn 5), die außerdem vorwiegend im Bereich kürzerer PSTV-Stücke liegen. Es dürfte sich hierbei also in erster Linie um Degradationsprodukte handeln. Damit konnte erstmals mit Hilfe der molekularen Hybridisierung bewiesen werden, daß PSTV in den Zellkernen der infizierten Pflanzen lokalisiert ist und nicht in der cytoplasmatischen Fraktion.

Die Hybridisierung bei 42°C ("Blot" a), bei der ebenfalls alle Hybride stabil sein sollten, war erheblich schwächer, in der Intensitätsverteilung der Banden entsprach sie jedoch dem Muster der 55°C-Hybridisierung.

Anders bei der 70°C-Hybridisierung ("Blot" c), die nur noch Hybride zwischen PSTV(+) und (-)RNA zuläßt. Auch hier traten insgesamt erheblich schwächere Signale auf als bei 55°C, vor allem aber fehlten die intensiven Banden im Bereich des zirkulären und linearen PSTV sowohl bei gereinigtem PSTV-Marker (Bahn 3) als auch in den Kernextrakten (Bahn 2,4). Deutliche Hybridisierungssignale sind bei den Kernextrakten jedoch im Bereich oberhalb der PSTV-Marker-Position zu erkennen, wo Nukleinsäuremoleküle zu erwarten sind, die länger sind als das PSTV. Im cytoplasmatischen Überstand (Bahn 5) ist keine Hybridisierung mehr zu erkennen.

Damit ergibt sich für die Hybridisierung mit ^{125}J -PSTV:

Bei 42°C ist die Hybridisierung insgesamt schwach, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß bei dieser Temperatur, die erheblich unter dem Schmelzpunkt des Viroids liegt (RIESNER et al., 1979), die radioaktive Probe nach der routinemäßigen Hitzedenaturierung (vergl. Methoden Kap. 5.11.2.) wieder renaturiert und aufgrund ihrer hohen intramolekularen Basenpaarung nicht zur Ausbildung intermolekularer Hybride in der Lage ist.

Bei 55°C ist die Hybridisierung sehr stark, dabei bilden sich auch die PSTV(+)(+)-Hybride, die nicht vollständig komplementär sind, so daß bei dieser Temperatur (+)PSTV mit (+)PSTV nachgewiesen werden kann.

Bei 70°C gibt es keine Hybridisierung mehr zwischen PSTV und ¹²⁵J-PSTV (also (+)(+)-Hybride), hier bilden offensichtlich nur noch die vollständig komplementären Stränge von (-)PSTV und ¹²⁵J-(+)PSTV thermostabile Komplexe. Ein sehr wichtiges Ergebnis der Hybridisierung bei 70°C sind die Hybridisierungssignale im Bereich oberhalb des zirkulären Viroidmoleküls ("Blot" c, Bahn 2,4). Hier muß es sich um die schon früher beschriebenen höhermolekularen PSTV-komplementären Moleküle, die vermuteten Replikationsintermediären, handeln (ROHDE und SÄNGER, 1981; BRANCH et al., 1981; MÜHLBACH et al., 1983). Die Hybridisierung bei 70°C im Bereich der höhermolekularen RNA zeigt, daß diese (-)PSTV-Moleküle, ebenso wie das (+)PSTV, im Zellkern lokalisiert sind. Dieser Befund untermauert entscheidend die Hypothese, daß die Viroidreplikation im Zellkern stattfindet.

Mit der verwendeten ¹²⁵J-PSTV Probe kann allerdings nicht entschieden werden, ob im Bereich der höhermolekularen PSTV RNA nur (-)PSTV-Moleküle vorkommen, oder ob es auch höhermolekulare (+)PSTV-Moleküle gibt, so daß für eine eindeutige Differenzierung der (+)- und (-)PSTV-Sequenzen eine andere Nachweismethode gefunden werden mußte.

3.4.1.2. (+)PSTV- und (-)PSTV-spezifische ^{32}P -markierte Oligodeoxyribonukleotide als Hybridisierungsprobe

Zum Nachweis von (+)- und (-)PSTV-Sequenzen aus Kern-RNA wurden chemisch synthetisierte, mit alpha- ^{32}P -ATP 5'-markierte DNA-Stücke von 14 und 15 Nukleotiden Kettenlänge eingesetzt, die auf dem PSTV(+)-Strang komplementär zu den Bereichen Nr. 97-110 (p14 I) und Nr. 259-273 (p15) sind und auf dem PSTV(-)-Strang komplementär zu Nr. 250-263 (p14 II) (Abb. 19; Tab. 3). Die Proben p14 I und p14 II sind komplementär zueinander, d.h. sie erfassen den (+)- bzw. (-)PSTV-Strang an einander entsprechenden Stellen. Wegen der 5'-->3'-Nummerierung der Stränge entspricht Nr.1 des (+)-Strangs der Nr.359 des (-)-Strangs und folglich die Nr.97-110 des (+)Strangs den Nr.263-250 des (-)-Strangs. Alle drei Sequenzen wurden von Frau Dipl. Chem. Martina Schnölzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Viroidforschung, synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

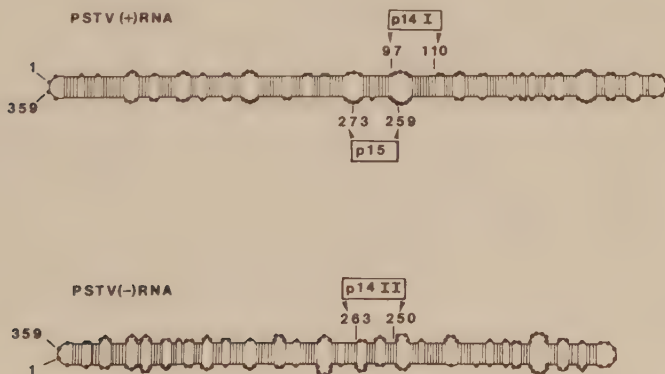


Abbildung 19:

Bereich der Basenpaarung zwischen den Bindestellen der Oligodeoxyribonukleotide p14 I und p15 und dem (+)PSTV-Molekül und p14 II und dem hypothetischen (-)PSTV-Molekül.

Tabelle 3:

Übersicht über die Nukleotidsequenzen der zur Hybridisierung eingesetzten Oligodeoxyribonukleotide

Probe	Sequenz 5'---3'	spezifisch für	Basenpaarung mit Nukleotid Nr.
p14 I	d(CGCTCCAGGTTTCC)	(+)PSTV	97-110
p15	d(GTTTCCACCGGGTAG)	(+)PSTV	259-273
p14 II	d(GGAAACCTGGAGCG)	(-)PSTV	250-263

Aufgrund der Kürze der Oligonukleotide mußte die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen drastisch reduziert werden. Die Stabilität von Hybriden mit 14 bzw. 15 Basenpaaren ist wesentlich niedriger als die von Ketten mit mehreren hundert Basenpaaren (J.MEINKOTH und WAHL, 1984). Die Reduktion der Stringenz wurde durch die Veränderung zweier Komponenten erreicht:

1) dem Hybridisierungspuffer wurde, anders als bei ^{125}J -PSTV als Hybridisierungsprobe, kein Formamid zugesetzt, das helixdestabilisierend wirkt und dadurch die Schmelztemperatur von Nukleinsäure-Doppelsträngen reduziert (J.MEINKOTH und WAHL, 1984) und

2) die Hybridisierungstemperatur wurde gesenkt und optimiert.

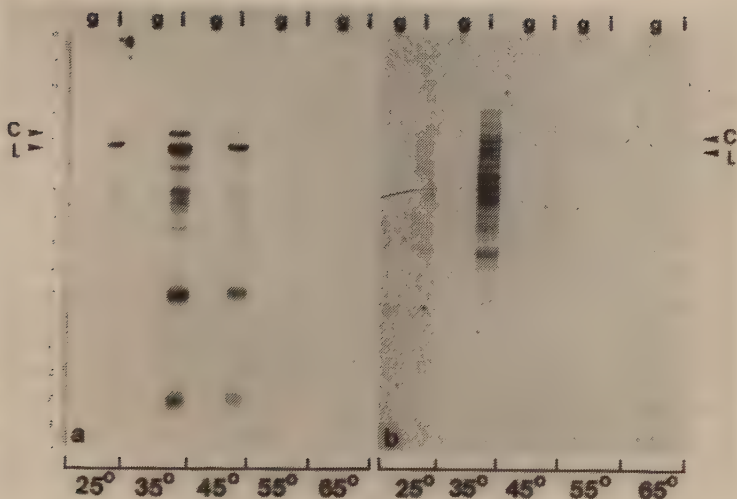


Abbildung 20:

Einfluß der Temperatur während der molekularen Hybridisierung auf den Nachweis von PSTV(+) und (-)RNA mit ^{32}P -markierten Oligodeoxyribonukleotiden. Autoradiogramm von "Northernblots" (vergl. Legende von Abb. 18) von 3,5% Polyacrylamidgelen mit glyoxalierten Proben, hybridisiert mit den ^{32}P -markierten PSTV(+)spezifischen Oligonukleotiden p14 I (a) und mit dem PSTV(-)spezifischen p14 II (b) bei 25°, 35°, 45°, 55° und 65°C. Jeder "Blot" enthält RNA aus 1×10^6 Zellkernen gesunder (g) und PSTV-infizierter (i) Kartoffelzellen.

Zunächst wurde in 10°-Intervallen zwischen 25° und 65°C der Bereich gesucht, in dem exakt optimiert werden sollte und in diesem in 3°-Intervallen die geeignetste Temperatur festgestellt (Abb. 20 und 21).

Die für diesen Test eingesetzten "Blot"s enthielten unter vollständig denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch getrennte RNA aus gesunden und PSTV-infizierten Kernen, gereinigtes PSTV und als Längenmarker ³²P-markierte Hinf I-Fragmente von pBR 322 DNA.

Bei den 10°-Intervallen lag das Temperaturoptimum für die (+)PSTV- wie für die (-)PSTV-spezifische Hybridisierung zwischen 35° und 45°C (Abb. 20). Infolgedessen wurde die Temperatur im Bereich von 35° bis 44°C in 3°-Intervallen variiert, d.h. Hybridisierungen wurden bei 35°, 38°, 41° und 44°C durchgeführt (Abb. 21). Die stärkste Hybridisierung war mit bloßem Auge bei 41°C zu erkennen, bei 44°C war die Hybridisierung wieder schwächer.

Dieses Temperaturoptimum war ebenfalls identisch für die (+)PSTV- und die (-)PSTV-spezifische Hybridisierung.

Die Hybridisierung unter diesen Bedingungen weist spezifisch PSTV nach, da mit RNA aus Zellkernen von nicht infizierten Zellen, im Gegensatz zu den Proben, in denen PSTV enthalten ist, keinerlei Hybridisierung erfolgte. Außerdem werden die bei der Hybridisierung mit der (+)PSTV-spezifischen Probe p14 I und mit der (-)PSTV-spezifischen Probe p14 II völlig verschiedenen Bandenmuster erhalten, was bei einer strangspezifischen Hybridisierung zu erwarten war.

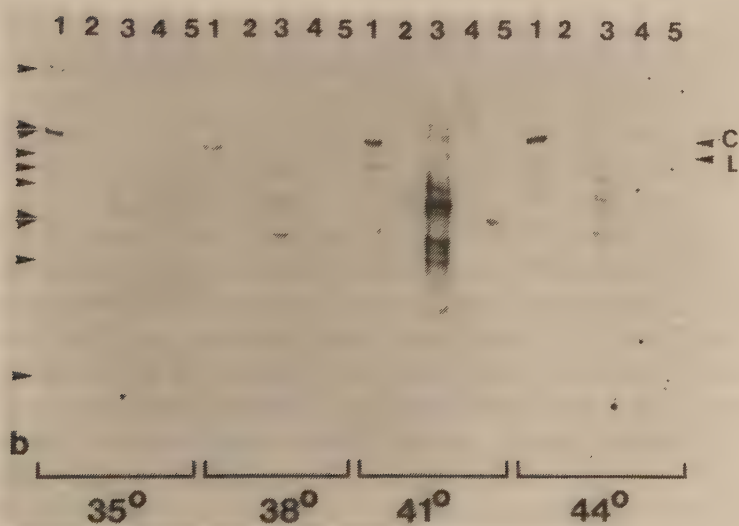
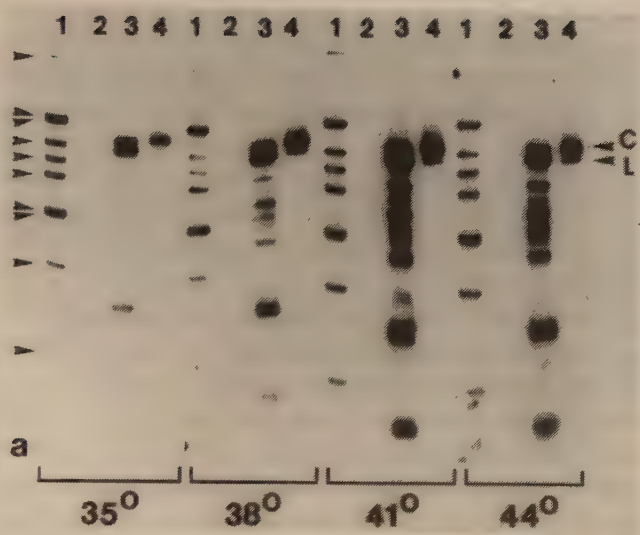


Abbildung 21:

Abb. 21, Legende:

Feinabstimmung des Temperaturoptimums der molekularen Hybridisierung zum Nachweis von PSTV(+) und PSTV(-)RNA mit ^{32}P -markierten Oligodeoxyribonukleotiden. Autoradiogramm von "Northernblots" von 3,5% Polyacrylamidgelen mit glyoxalierten Proben (vergl. Legende von Abb. 18), hybridisiert mit ^{32}P -markierten (+)spezifischen Oligodeoxyribonukleotiden p14 I (a) und (-)spezifischen p14 II (b) bei 35° , 38° , 41° und 44°C .

In Abb. 21 a und b enthalten die Bahnen 1-3 folgende Proben:

Bahn 1: HinfI-Fragmente von pBR 322 DNA als Längenmarker, die mit Pfeilen markierten Banden enthalten von oben nach unten DNA-Ketten mit folgender Nukleotidzahl: 1631, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154 und 75 (Pfeile); Bahn 2: RNA von 1×10^6 isolierten Zellkernen gesunder Kartoffelzellen; Bahn 3: RNA von 1×10^6 isolierten Zellkernen PSTV-infizierter Kartoffelzellen. In Abb. 21a enthält Bahn 4: 10ng gereinigtes PSTV als Marker.

In Abb. 21 b enthält Bahn 4: RNA von 1×10^6 PSTV-infizierten ganzen Kartoffelzellen und Bahn 5: 10ng gereinigtes PSTV.

C: zirkuläres PSTV

L: lineares PSTV

Mit der (+)PSTV-spezifischen Probe p14 I erhielt man bei dem gereinigten PSTV-Marker (Bahn 4) und bei den RNA-Proben aus infizierten Zellkernen (Bahn 3) auf der Höhe des zirkulären und des linearen PSTV jeweils ein kräftiges Signal. Außerdem treten im Bereich der RNA größer als Viroid-Einheitslänge nur zwei diskrete Banden auf. Mit der (-)PSTV-spezifischen Probe p14 II hingegen traten im Falle der Zellkerne (Bahn 3) und der ganzen Zellen (Bahn 4) im Bereich größer als Viroid-Einheitslänge zahlreiche Banden auf, bis hinauf zu etwa vierfacher Einheitslänge. Beim PSTV-Marker (Bahn. 5) war fast kein Signal zu sehen und

nur ganz schwache Banden auf der Höhe der zirkulären und linearen PSTV RNA bei den RNA-Extrakten aus isolierten Zellkernen (Bahn 3) und ganzen Zellen (Bahn 4).

Im Bereich der RNA-Ketten kürzer als Viroid-Einheitslänge erhielt man mit jeder der Proben ein etwas anderes Bandenmuster. Die kürzesten noch nachgewiesenen RNA-Ketten enthielten etwa 60 Nukleotide.

Damit standen für den Nachweis von (+)PSTV und (-)PSTV in Kernextrakten mit den synthetischen Oligodeoxyribonukleotiden selektiv wirksame Hybridisierungsproben zur Verfügung, mit deren Hilfe sich eindeutige Aussagen über die Existenz von (+)PSTV und (-)PSTV-Sequenzen in isolierten Zellkernen machen ließen. Im Falle der kurzen PSTV-Stücke, die nicht die volle PSTV-Sequenz enthalten, können allerdings alle diejenigen nicht erfaßt werden, die die Bindestellen der Oligonukleotide nicht enthalten.

3.4.2. Nachweis von (+)PSTV- und (-)PSTV-Sequenzen in RNA von isolierten Zellkernen durch molekulare Hybridisierung mit Oligodeoxyribonukleotiden

Der Nachweis von PSTV-Sequenzen beider Polaritäten in RNA-Extrakten aus PSTV-infizierten Zellkernen und, im Vergleich dazu, aus ganzen Zellen erfolgte jeweils bei 41°C mit den ^{32}P -markierten Oligodeoxyribonukleotiden, die zu verschiedenen Bereichen des (+)PSTV-Stranges (p14 I und p15) und zu einem Bereich des (-)PSTV-Stranges (p14 II) komplementär sind. Sie wurden so eingesetzt, daß im Hybridisierungspuffer etwa 1×10^6 cpm/ml enthalten waren.

In Abb. 22 ist das Ergebnis eines entsprechenden Experiments dargestellt. Folgende vollständig denaturierten, gelelektrophoretisch getrennten Proben waren durch "Elektro-Blotting" auf die Transfermembran übertragen worden:

- Bahn 1: Längenmarker aus Hinf I-Fragmenten von pBR 322 DNA
(vergl. Abb. 21)
- Bahn 2: Nukleinsäureextrakt aus 1×10^6 gereinigten Kernen von gesunden Kartoffelzellen
- Bahn 3: Nukleinsäureextrakt aus 1×10^6 gereinigten Kernen von PSTV-infizierten Kartoffelzellen
- Bahn 4: Nukleinsäureextrakt aus 1×10^6 PSTV-infizierten ganzen Kartoffelzellen
- Bahn 5: 10ng hochgereinigtes PSTV als Marker

Da der Nachweis von (+)PSTV-Sequenzen mit zwei verschiedenen Proben, pl4 I und pl5, erfolgte, die mit zwei fast gegenüberliegenden Stellen des (+)PSTV Moleküls hybridisieren (vergl. Abb. 20.), konnten damit verschiedene Teilstücke des PSTV Moleküls erfaßt werden. Ein Vergleich der Bandenmuster im Bereich der nicht vollständigen, kürzeren PSTV-Moleküle gibt Aufschluß über die Existenz von Teilstücken aus verschiedenen Bereichen des Moleküls. Ein derartiger Vergleich war nur für (+)PSTV möglich, da nur hier verschiedene Oligodeoxyribonukleotide zur Verfügung standen.

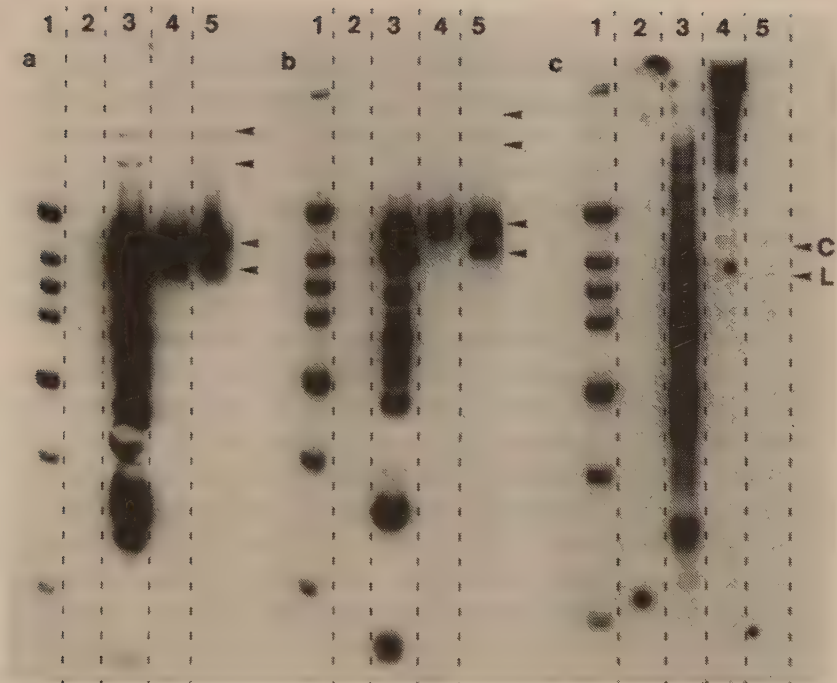


Abbildung 22:

Vergleich der durch die verschiedenen ^{32}P -markierten Oligodeoxyribonukleotide nachgewiesenen PSTV(+) und (-)RNA in isolierten Zellkernen und ganzen Zellen. Autoradiogramm von "Northernblots" von 3,5% Polyacrylamidgelen mit glyoxalierten Proben (vergl. Legende von Abb. 18), hybridisiert mit ^{32}P -markierten (+)spezifischen Proben p14 I (a) und p15 (b) und der (-)spezifischen Probe p14 II (c) bei 41°C . Die Bahnen der drei "Blots" enthalten folgende Nukleinsäuren: Bahn 1: Längenmarker aus *Hinf* I-Fragmenten von pBR 322 DNA (vergl. Abb. 21), Bahn 2: RNA aus 1×10^6 gereinigten Kernen von gesunden Kartoffelzellen, Bahn 3: RNA aus 1×10^6 Zellkernen von PSTV-infizierten Kartoffelzellen, Bahn 4: RNA aus 1×10^6 PSTV-infizierten ganzen Kartoffelsuspensionszellen und Bahn 5: 10ng hochgereinigtes PSTV als Marker.

Da PSTV-Monomere zwangsläufig beide Bindestellen enthalten, entspricht es auch den Erwartungen, daß zirkuläres und lineares PSTV bei beiden Proben in gleicher Weise sichtbar wurden (Abb. 22 a und b, Bahn 3,4 und 5).

Völlig neu und bis dahin noch nicht beobachtet war das Auftreten von PSTV(+)RNA-Oligomeren, die, wie leicht einzusehen, ebenfalls mit beiden Proben sichtbar gemacht wurden (Abb. 22 a und b, Bahn 3). Die Nukleotidzahl der PSTV-Sequenzen dieser beiden Banden konnte anhand der Position der Längenmarker auf ungefähr 860 und 1150 geschätzt werden, was etwa der 2- und 3fachen PSTV-Einheitslänge entspricht. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die absolute Kettenlänge nicht bestimmt werden kann, da für diesen Bereich nur DNA-Längenmarker verfügbar sind und DNA und RNA gleicher Länge nicht genau gleiche Wanderungstrecken aufweisen. Im Vergleich zu den restlichen Banden verursachen diese beiden nur ein sehr schwaches Signal. Die starke Anreicherung in der Fraktion nukleärer RNA ist offensichtlich für ihr Erscheinen unabdingbar, da sie in den Extrakten aus ganzen Zellen nicht zu sehen sind (Abb. 22 a und b, Bahn 4). Bei den RNA-Extrakten aus ganzen Zellen machen die im Cytoplasma befindliche RNA sowie mitochondriale und proplastidäre Nukleinsäuren einen sehr großen Teil aus, so daß bei der auf ein Gel aufgetragenen RNA-Menge der Anteil an PSTV(+)RNA-Oligomeren sicherlich unter der Nachweisgrenze liegt. Die schwachen Banden am oberen Rand des "Blots" in den Proben der ganzen Zellen (Bahnen 4) sind auf unspezifische Hybridisierung mit der ribosomalen 16S RNA zurückzuführen, die im Nukleinsäureextrakt aus ganzen Zellen, nicht aber aus isolierten Kernen vorhanden ist.

Für den Nachweis von (-)PSTV wurde die ^{32}P -markierte Probe p14 II, die komplementär zu den Nukleotiden Nr. 250-263 des (-)PSTV-Strangs ist (also die Sequenz des (+)Strangs von Nr. 97-110 hat) eingesetzt.

Der PSTV-Marker enthält kaum (-)PSTV, es trat nur ein

Hauch einer Schwärzung auf (Bahn 5). Die gesunde Kontrolle enthielt, wie erwartet, keine Sequenzen, die von p14 II erkannt werden. Die RNA aus infizierten Kernen enthielt (-)PSTV-Sequenzen mit Kettenlängen im Bereich von etwa 70 bis rund 1400 Nukleotiden (Abb. 22 c, Bahn 3). Auch hier zeigte sich nur eine schwache Hybridisierung auf Höhe des zirkulären und des linearen PSTV.

Es treten also mehrere Banden oligomerer (-)PSTV-Moleküle auf, die bis zu dem 4fachen der PSTV-Einheitslänge reichen. Auf der Höhe des monomeren PSTV findet man nur ganz schwache Banden, jedoch zahlreiche Banden von (-)PSTV-Molekülen, die kleiner als PSTV-Einheitslänge sind. Bei den kurzen (+)PSTV- und (-)PSTV-Sequenzen handelt es sich entweder um PSTV-Moleküle, die zum Zeitpunkt der Isolation und Extraktion der Kerne noch nicht fertiggestellt waren oder um Bruchstücke der höhermolekularen PSTV-Spezies, die während der Zellkernisolation an definierten Stellen auseinandergebrochen waren. Dabei ist der zweiten Erklärung der Vorzug zu geben, da die Bruchstücke in den Extrakten aus ganzen Zellen (Bahn 4) nicht auftreten, was jedoch der Fall sein müßte, wenn es sich um nicht fertig synthetisierte Stücke handelte. Auch in der RNA aus ganzen Zellen (Bahn 4) sind bei (-)PSTV-spezifischer Hybridisierung im Bereich des zirkulären und linearen PSTV kaum Banden zu erkennen, die kurzen PSTV-Moleküle fehlen vollständig, dafür treten jedoch wesentlich größere Oligomere auf. Allerdings wird hier die Aussagemöglichkeit durch die unspezifische Hybridisierung mit der in dieser Probe vorhandenen ribosomalen 16S RNA erschwert.

Für den (+)- und (-)PSTV-Nachweis mit Oligodeoxyribonukleotiden in RNA aus ganzen Zellen erwiesen sich die für Zellkern-RNA ermittelten optimalen Hybridisierungstemperaturen als nicht geeignet, da die Zellextrakte, im Gegensatz zu den Kernextrakten, in großem Maße ribosomale RNA enthalten, die durch unspezifische Hybridisierung PSTV-Sequenzen vortäuscht.

3.4.3. Untersuchung der Nukleinsäurenatur der (+) und (-)PSTV-Sequenzen in Zellkernen

Um die Nukleinsäurenatur der verschiedenen (+)PSTV- und (-)PSTV-Moleküle festzustellen d.h. zu prüfen, ob sie aus RNA, DNA oder RNA-DNA Hybriden bestehen, einzel- oder doppelsträngig sind, wurden die Nukleinsäuren der gereinigten Zellkerne mit Hilfe von Phenol extrahiert, mit Alkohol präzipitiert, das Sediment getrocknet, in sterilem H₂O aufgenommen und mit verschiedenen Nukleasen behandelt. Die Nukleasen benötigen unterschiedliche Pufferbedingungen für ihre spezifische Wirkungsweise (BRANCH et al., 1981), die durch entsprechende Zugabe der 4-fach konzentrierten Puffer eingestellt wurden.

Folgende Nukleinsäuren wurden bei 37°C mit verschiedenen Nukleasen inkubiert:

Nukleinsäureäquivalent von 6×10^6 PSTV-infizierten Zellkernen,

40ng Carna5 als dsRNA-Kontrolle ("double stranded"RNA),

40ng 5S RNA aus Kaninchen-Leber als ssRNA-Kontrolle ("single stranded"RNA) und

40ng PSTV

Die verwendeten Nukleasen und ihre Spezifität sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Die Inkubation wurde durch Abkühlen auf 0°C in Eis gestoppt und die Ansätze sofort phenolisiert und mit Alkohol gefällt. Die getrockneten Präzipitate der "verdauten" RNA-Proben wurden in H₂O aufgenommen, glyoxaliert, halbiert und beide Hälften über 3.5% PAA-Phosphatgele getrennt. Die beiden Gele, die die Zellkern-RNA-Ansätze in identischer Reihenfolge enthielten, wurden geblottet und mit (+) bzw. (-) PSTV-spezifischen Oligonukleotid-Proben hybridisiert. Die Gele mit den Kontroll-RNA-Proben Carna5 für dsRNA, Kaninchen 5S RNA für ssRNA und PSTV wurden silbergefärbt. Die Versuchsergebnisse sind in den Abbildungen 23-25 dargestellt.

Tabelle 4:

Spezifität der verschiedenen getesteten Nukleasen unter den entsprechenden Versuchsbedingungen:

Nuklease	Menge	Reaktionsbed.	Spezifität
DNase I	2µg	NEB, 15 min	degradiert DNA vollständig
RNase III	0,8U	NEB, 1h	baut dsRNA-Ketten von mehr als 15 Basenpaaren Kettenlänge ab
RNase A	0,02µg	NEB, 1h (="niedrig-Salz")	baut ssRNA und dsRNA vollständig ab, spaltet neben Pyrimidin-Resten
RNase A	0,02µg	"hoch-Salz", 1h	degradiert unter diesen Bedingungen ssRNA
RNase H	1,6U	NEB, 1h	degradiert DNA-RNA-Hybride
RNase T ₁	1U	"niedrig-Salz", 1h	degradiert bei niedriger Konzentration ssRNA unvollständig, spaltet neben Guanosin-Resten
RNase T ₂	1,25U	Ammoniumacetat, 2h	degradiert dsRNA unvollständig, spaltet vor Adenin-Resten

Reaktionsbedingungen: "NEB", "niedrig Salz", "hoch Salz" und "Ammoniumacetat" wie in Methoden Kap.5.6.1. beschrieben.

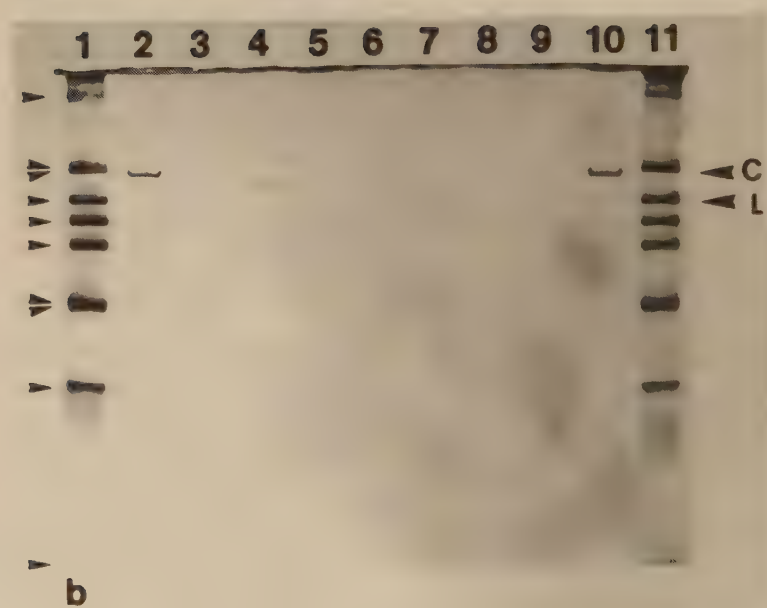
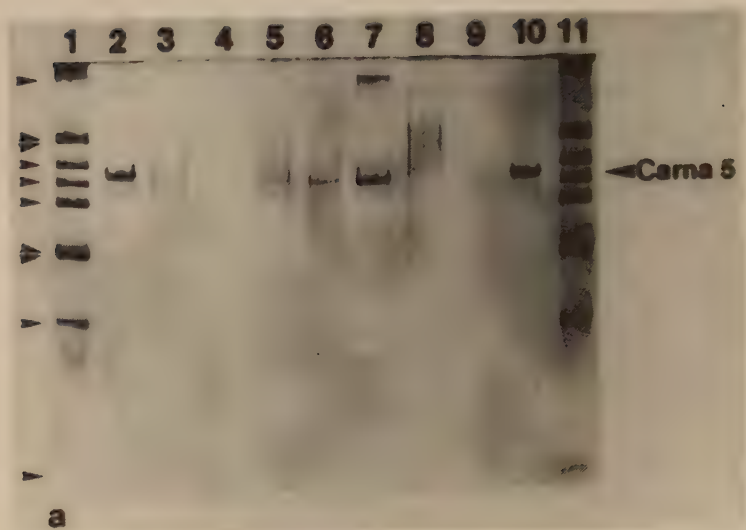


Abbildung 23:

(Abb. 23, Fortsetzung)

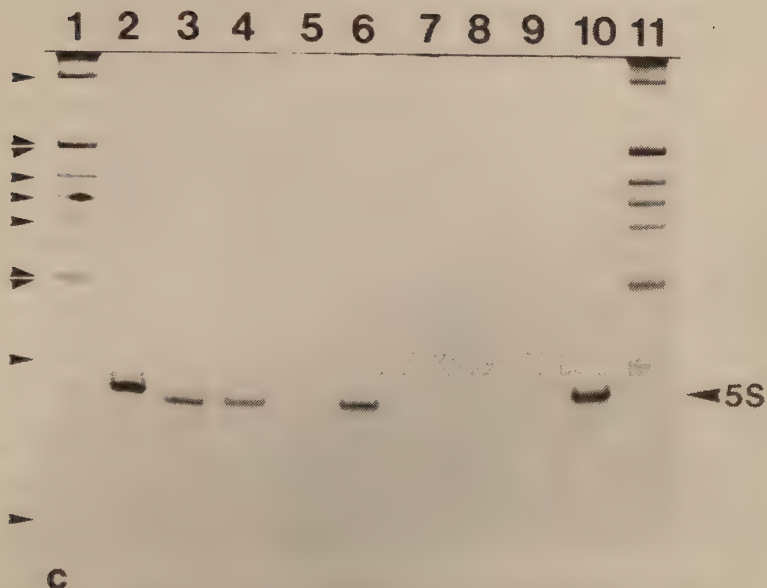


Abbildung 23:

Vergleich der Wirkung verschiedener Nukleasen auf dsRNA (Carna 5), PSTV und ssRNA (5SRNA). Die Proben wurden glyoxaliert, über 3,5% Polyacrylamidgele elektrophoretisch getrennt und silbergefärbt. Abb. 23a zeigt die Wirkung der eingesetzten Nukleasen auf dsRNA: Carna 5, Abb. 23b auf PSTV und Abb. 23c auf ssRNA: 5S RNA.

Die Bahnen der drei Gele enthalten die jeweilige RNA, die mit verschiedenen Nukleasen behandelt wurde, in gleicher Reihenfolge: Die Bahnen 1 und 11 enthalten Hinfl-Fragmente von pBR 322 DNA als Längenmarker (vergl. Abb. 21 a), Bahn 2: die jeweilige unbehandelte RNA, Bahn 3: die jeweilige RNA mit DNase I verdaut, Bahn 4: mit RNase III, Bahn 5: mit RNase A unter "niedrig-Salz"-Bedingungen, Bahn 6: mit

(Abb. 23, Fortsetzung)

RNase H, Bahn 7: mit RNase T₁, Bahn 8: mit RNase A unter "hoch-Salz"-Bedingungen, Bahn 9: mit RNase T₂ und Bahn 10: nochmals unbehandelt.

Bei diesen Kontrollversuchen zeigte sich, daß die Carna5-Probe offensichtlich mit RNasen kontaminiert war, da nur die unbehandelte Probe, die nicht auf 37°C erwärmt worden war, ohne Schmierbereiche auf dem Gel getrennt wurde. Trotzdem sind noch Aussagen über die Wirkungsweise der verschiedenen Nukleasen möglich. Wie erwartet, zeigen nur die mit RNase III und RNase T₂ behandelten Carna5-Proben (Abb. 23a, Bahn 4 und 9) keinerlei RNA-Banden mehr, d.h. RNA-Doppelstränge werden von diesen RNasen vollständig abgebaut.

DNase I greift weder PSTV noch ssRNA noch dsRNA an (Abb. 23a-c, Bahn 3), wobei allerdings die Aussage durch die Kontamination der Carna 5 RNA Probe erschwert wird.

RNase III baut dsRNA mit Doppelstrangbereichen von mehr als 15 Basenpaaren, wie Carna5, vollständig ab, ssRNA und PSTV werden nicht angegriffen (Bahnen 4).

RNase A baut unter "niedrig-Salz"-Bedingungen ssRNA und PSTV vollständig ab, dsRNA wird jedoch offenbar nicht angegriffen (Bahnen 5).

RNase H läßt ssRNA, dsRNA und PSTV unberührt (Bahn 6).

RNase T₁ baut ssRNA und PSTV vollständig ab und läßt dsRNA unberührt (die Bande am oberen Gelrand muß wohl auf unvollständige Glyoxalierung zurückgeführt werden, da ihr Auftreten singulär ist) (Bahnen 7).

RNase A baut unter "hoch-Salz"-Bedingungen einzelsträngige 5S RNA und PSTV ab (Bahnen 8).

RNase T₂ baut nicht nur, gemäß ihrer Spezifität, dsRNA, sondern auch ssRNA und PSTV ab, offensichtlich ist sie mit anderen RNasen kontaminiert (Bahnen 9).

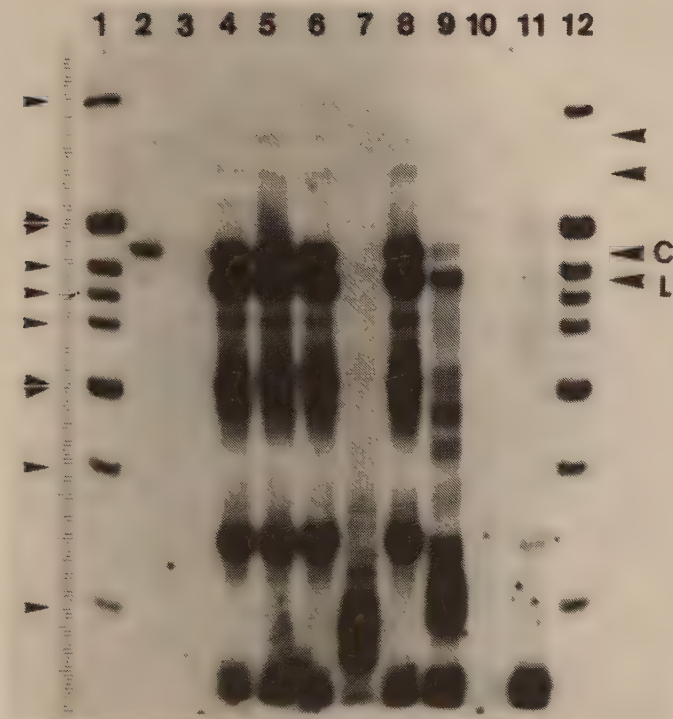


Abbildung 24:

Vergleich der Wirkung der verschiedenen Nukleasen auf (+)PSTV-Moleküle. Autoradiogramm eines "Northernblots" von einem 3,5% Polyacrylamidgel mit glyoxalierten Proben (vergl. Legende von Abb. 18), hybridisiert mit ^{32}P -markiertem (+)spezifischem p14 I bei 41°C .

Bahn 1 und 12 enthalten HinfI-fragmentierte pBR 322 DNA (vergl. Abb. 21 a), Bahn 2 enthält 10ng gereinigtes PSTV als Marker, Bahn 3: RNA aus 3×10^6 Zellkernen aus gesunden Zellen und Bahn 4: RNA aus ca. 3×10^6 Zellkernen aus PSTV-infizierten Zellen. Die Bahnen 5-11 enthalten RNA aus isolierten PSTV-infizierten Zellkernen, die mit verschiedenen Nukleasen behandelt wurde: Bahn 5: mit DNase I, Bahn 6: mit RNase III, Bahn 7: mit RNase A unter "niedrig-

(Abb. 24, Fortsetzung)

Salz"-Bedingungen, Bahn 8: mit RNase H, Bahn 9: mit RNase T₁, Bahn 10: mit RNase A unter "hoch-Salz"-Bedingungen und Bahn 11: mit RNase T₂.

Die Bedingungen der Nuklease-Behandlung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

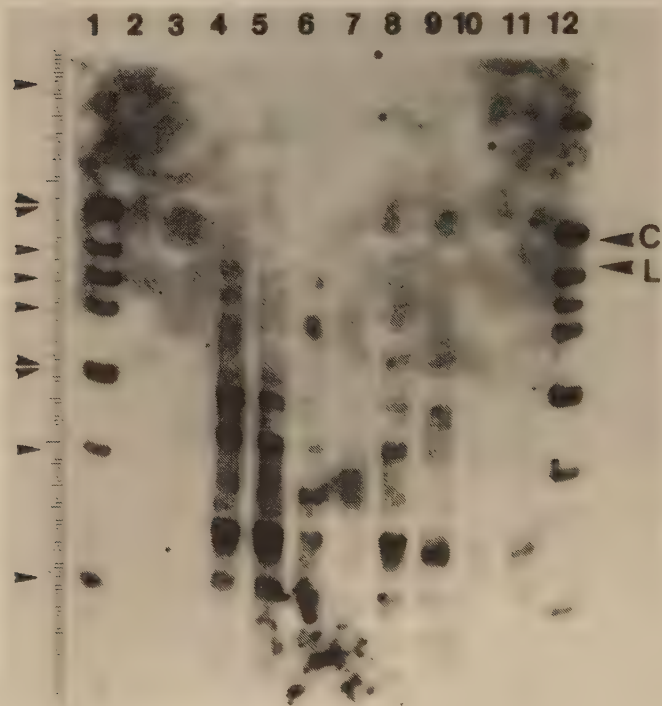


Abbildung 25:

Vergleich der Wirkung der verschiedenen Nukleasen auf (-)PSTV Moleküle. Die Behandlung der Proben erfolgte wie in Abb. 24, der "Blot" wurde aber mit dem PSTV(-)spezifischen p14 II hybridisiert.

Für die verschiedenen PSTV-Spezies in RNA aus isolierten Zellkernen ergab sich folgendes Bild (Abb. 24 und 25):

1.) alle (+)PSTV-Sequenzen, also die Di- und Trimeren, die Monomeren und auch die kürzeren Stücke sind resistent gegen DNase, RNase III und RNase H. Sie werden angegriffen von RNase A unter "hoch"- und "niedrig-Salz"-Bedingungen, von RNase T₁ und von der offensichtlich mit anderen RNasen kontaminierten und damit nicht mehr spezifischen (siehe Kontrollversuche) RNase T₂. Daraus folgt, daß sie aus einzelsträngiger RNA bestehen.

2.) Die (-)PSTV-Sequenzen sind resistent gegen DNase und RNase H. Sie werden, besonders im oligomeren Bereich von RNase III angegriffen und von RNase T₂ (kontaminiert!) weitestgehend abgebaut. RNase A baut sie unter "hoch"- und "nieder-Salz"-Bedingungen ab und RNase T₁ greift die niedermolekularen Stücke stärker an als die Oligomeren. Daraus kann man folgern, daß (-)PSTV-Moleküle in dsRNA- und ssRNA-Bereichen vorliegen, wobei die ds-Bereiche in erster Linie in oligomeren Molekülen auftreten.

3.5. Ausarbeitung der Bedingungen für die in vitro RNA-Synthese mit isolierten Zellkernen

3.5.1. Optimierung der Testpufferzusammensetzung

Die optimale Zusammensetzung des Testpuffer für die ^3H -UMP-Inkorporation von Kartoffelzellkernen wurde auf der Basis des von WILLMITZER und WAGNER (1981) beschriebenen Puffers durch Variation der MgCl_2 -, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - und EDTA-Konzentration ermittelt. Folgende Konzentrationen wurden getestet:

MgCl_2 : 1mM; 3mM; 5mM; 7mM; 10mM

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 10mM; 20mM; 40mM; 80mM

EDTA: 0,1mM; 1mM; 5mM; 10mM; 15mM

Dazu kam jeweils ein Kontrollansatz mit ursprünglicher Pufferzusammensetzung und einer, der $2\mu\text{g/ml}$ alpha-Amanitin enthielt. Abgesehen von der Variation verschiedener Pufferkomponenten wurde der Versuchsablauf der ^3H -UMP-Inkorporation nicht verändert.

Nach 0, 10, 20, 60, 90 und 120 min wurden $25\mu\text{l}$ -Aliquots entnommen, auf Filterpapierstreifen aufgebracht, chromatographisch von den nicht inkorporierten Triphosphaten gereinigt und mit Szintillatorcocktail im Tritium-Kanal gemessen. In allen Variationen unterschieden sich die Einbauraten nur unwesentlich, so daß lediglich die EDTA-Konzentration von 0,1mM auf 1mM erhöht wurde, alles andere blieb unverändert.

3.5.2. Unterdrückung von RNase-Aktivität während der Zellkerninkubation

Da ein in vitro Ansatz mit isolierten Zellkernen nicht von RNasen frei gehalten werden kann, mußte untersucht werden, welcher der zur Verfügung stehenden Inhibitoren am wirksamsten ist, um den Abbau frisch synthetisierter RNA-Stücke zu verhindern. Dazu wurde RNA aus Zellkernen mit verschiedenen Konzentrationen von RNase A und verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Der Testansatz ent-

hielt in 60µl Testpuffer:

50µg RNA, jeweils einen der folgenden RNase-Inhibitoren: 30mM Jodacetat (JAc), 0,4mM Aurintricarbonsäure (ATA), 10mM Hydroxystilbamidin (HSA), 10mM Vanadylribonukleosidkomplex (VRC), 25mM Pyrophosphat (PP) und, als Kontrollansätze, 100 units RNasin sowie RNase A in den folgenden Mengen:

5,2µg (1), 520ng (2), 52ng (3), 5,2ng (4) und 0,52ng (5). Ein Kontrollansatz (0) enthielt keine RNase A.

Die sich daraus ergebenden Ansätze wurden 15min bei 37°C inkubiert, phenolisiert, alkoholgefällt, glyoxaliert und über 3% Polyacrylamidgele getrennt. Dabei entsprechen die Nummern der RNase A-Konzentrationen den Probennummern in Abb. 26.

RNasin zeigte die beste Wirkung als RNase-Inhibitor, schon bei 52ng RNase/60µl (Abb. 26, Bahn 3) wird die RNA zum Teil vor dem Abbau geschützt und bei niedrigerer RNase-Konzentration bleibt sie völlig unversehrt. RNasin ist jedoch ein relativ teurer Inhibitor, dessen Qualität stark schwankt und dessen Stabilität außerdem nicht besonders groß ist. Ein stabiler Inhibitor wäre zu bevorzugen. Dafür kam nur VRC in Frage, der nach RNasin den besten Schutz der RNA vor nukleolytischer Degradation ergab (Abb. 26).

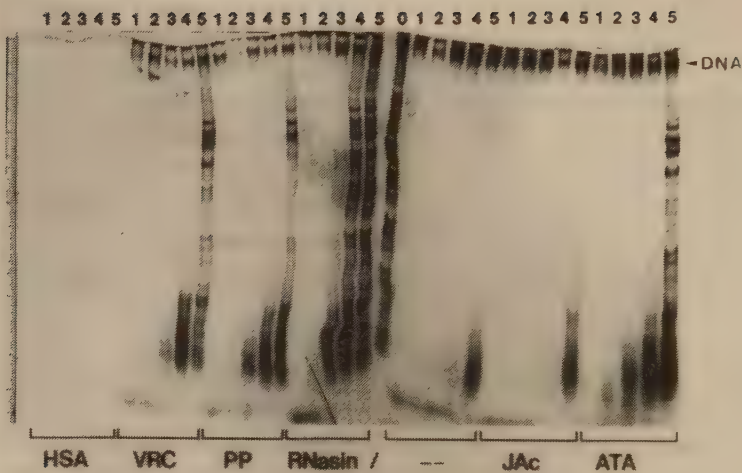


Abbildung 26:

Vergleich der schützenden Wirkung verschiedener RNase-Inhibitoren auf RNA-Präparationen aus Kartoffelzellen unter Anwesenheit unterschiedlicher Mengen von RNase A. Um die Wirksamkeit der unterschiedlichen RNase-Inhibitoren zu testen, wurde RNA aus Kartoffelzellen mit den Inhibitoren und verschiedenen Konzentrationen RNase A inkubiert. Die RNA aus den einzelnen Ansätze wurde in 3% Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt und silbergefärbt. Die Bahnen enthalten, entsprechend den Nummern, die phenolierte und glyoxalierte RNA aus den oben beschriebenen Ansätzen: also RNA, den jeweiligen RNase-Inhibitor und RNase A in folgenden Mengen: 5,2µg (Bahnen 1), 520ng (Bahnen 2), 52ng (Bahnen 3), 5,2ng (Bahnen 4) bzw. 0,52ng (Bahnen 5) sowie keine RNase (Bahn 0). Außer RNasin zeigen VRC, PP und ATA einen inhibitorischen Effekt.

HSA scheint sich mit den Nukleotiden so fest zu verbinden, daß es während der Phenolisierung haften bleibt und so die Nukleinsäuren offensichtlich mit in die Phenolphase reißt, die wässrige Phase, in der sich normalerweise die Nukleinsäuren befinden, enthält kaum noch RNA (Abb.26, HSA, Bahn 1-5).

JAc bietet fast keinen Schutz vor RNasen, nur bei der niedrigsten RNase-Konzentration unterscheidet sich das Bild etwas von der Probe ohne Inhibitor (JAc, Bahn 5).

ATA, VRC und PP, die alle drei eine gewisse inhibitorische Wirkung zeigten, wurden in höheren Konzentrationen weitergetestet und mit RNasin (100U) verglichen:

ATA: 0,4mM (I), 0,8mM (II) und 1,6mM (III)

VRC: 10mM (I), 20mM (II) und 40mM (III)

PP: 25mM (I), 50mM (II) und 100mM (III)

In Tabelle 5 ist die Menge an RNase A/60µl Reaktionsansatz angegeben, bei der die Inhibitoren in der jeweiligen Konzentrationsstufe noch einen vollständigen Schutz der nukleären RNA vor dem Abbau durch RNase A gewährleisten.

Tabelle 5:

Wirksamkeit verschiedener RNase-Inhibitoren zum Schutz nukleärer RNA gegenüber dem Abbau durch RNase A:

Konzentrations- stufe der Inhi- bitoren:	I	II	III
	Gehalt an RNase A in 60µl Reaktions- ansatz, bei dem noch eine wirksame Hemmung des RNA-Abbaus erreicht wird:		
Inhibitor			
RNasin	5,2ng	-	-
VRC	520pg	5,2ng	5,2ng
ATA	520pg	520pg	520pg
PP	520pg	5,2ng	52ng

"-": höhere Konzentration nicht getestet

Dabei zeigte sich 100mM PP als besserer Inhibitor als RNasin, es schützt RNA sogar noch in Anwesenheit von 52ng RNase A. Als Zusatz für einen Transkriptionsansatz ist es jedoch ungeeignet, da es als "Abfallprodukt" beim ATP-Verbrauch im Überschuß auch die Transkription hemmt und nicht nur die RNase-Aktivität.

Die nächst beste Wirkung zeigte VRC, er schützt die RNA bei Anwesenheit von 5.2ng RNase/60µl bei einer Konzentration von 20mmol/l wie bei 40mmol/l gegen Degradation. Nachdem festgestellt worden war, daß dieser Komplex offensichtlich die Kernmembran nicht passiert, da er die RNA-Synthese in Kernen nicht hemmt, wurde er alternativ zu RNasin verwendet. Er ist wirksam für alle Nukleinsäuren, die den Kern verlassen haben.

Die Wirkung von ATA war am schwächsten, ihre Anwendung wurde daher nicht weiter diskutiert.

3.5.3. Voraussetzungen für die RNA-Synthese in isolierten Zellkernen

Je 4×10^6 Kerne (gesunde und PSTV-infizierte) wurden in Testpuffer mit 40mM VRC oder 100 Units RNasin (zu dessen Stabilisierung auch noch 5mM DTT zugegeben wurde), je 0,3mM ATP, GTP und CTP, 0.02mM UTP und 250 - 500 μ Ci α - 32 P-UTP ($\Delta 6.1 - 12.2$ nmol) in einem Volumen von 200 μ l 30 min lang bei 29°C inkubiert und für die Analyse der Transkriptionsprodukte anschließend sofort phenolisiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Gelfiltration über Biogel A 0.5 von den nicht eingebauten Nukleosidtriphosphaten getrennt und lyophilisiert.

Um ausschließen zu können, daß es sich bei den 32 P-markierten Syntheseprodukten der isolierten Kerne eventuell um das Ergebnis terminaler Transferasen und nicht um Template-spezifische Neusynthese handelt, wurden dem Transkriptionsansatz außer 32 P-UTP keine anderen Nukleosidtriphosphate zugefügt, so daß nur die im Kern noch vorhandenen Nukleosidtriphosphate und das radioaktive 32 P-UTP eingebaut werden konnten.

Ist die Synthese templateabhängig, so bricht die Transkription ab, sobald mindestens eines der gespeicherten Triphosphate verbraucht ist. Die Syntheserate und damit der Einbau von 32 P-UMP muß also um ein Vielfaches niedriger sein als in Anwesenheit ausreichend großer Mengen aller Triphosphate.

Werden jedoch durch die Aktivität terminaler Transferasen am Kettenende templateunabhängig Nukleotide angehängt, geschieht dies auch, wenn nur ein Nukleosidtriphosphat, z.B. UTP, zur Verfügung steht. Es werden beliebig viele 32 P-UMP-Reste angehängt, der 32 P-UMP-Einbau ist nicht reduziert.

Die Untersuchung ergab, daß in Abwesenheit nicht radioaktiver Nukleosidtriphosphate die Einbaurate auf 0.06% sank (Tab.6).

Ein weiterer Hinweis auf die Templateabhängigkeit der in vitro synthetisierten RNA-Produkte der Zellkerne war der Befund, daß nach Zerstörung des DNA-Templates durch eine 30-minütige Vorinkubation der Transkriptionsansätze mit RNase-freier DNase I der Gesamteinbau auf 0,1% sank.

Um eine unverminderte Syntheserate zu erzielen, mußte außerdem die Aktivität der nukleären DNA-abhängigen RNA-Polymerasen voll erhalten sein. Enthielten nämlich die Ansätze alpha-Amanitin, das bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/l die DNA-abhängige RNA-Polymerase II zu 95% und die DNA-abhängige RNA-Polymerase III zu 40% hemmt (JENDRISAK, 1980), oder Actinomycin D, das die Transkriptionskomplexe der verschiedenen RNA-Polymerasen unterschiedlich stark stört (REICH und GOLDBERG, 1969) (vergl. Kap. 3.6.4.1.), so sank die Gesamtsyntheseaktivität im Falle des alpha-Amanitin auf 6% und mit Actinomycin D auf 38% ab (Tab. 6).

Es konnte daher ausgeschlossen werden, daß die markierten Produkte durch die Aktivität terminaler Transferasen entstehen, sie sind vielmehr Transkripte der im Kern vorhandenen DNA-abhängigen RNA Polymerasen.

Interessanterweise war in den meisten Experimenten die UMP-Inkorporation in Kernen aus PSTV-infizierten Zellen etwa doppelt so hoch wie in Kernen aus gesunden Zellen (Tab. 6).

Tabelle 6:

RNA Polymerase Aktivität in isolierten Zellkernen aus
Kartoffelsuspensionskulturen:

Zellkerne isol. aus	Variation des Ansatzes	pMol UMP pro 10 ⁶ Kerne	Prozent des Kontrollwerts
PSTV-infiz. Kartoffel- zellen	---	459,1	100
	+ 2µg/ml alpha-Am.	27,5	6,0
	+ 10µg/ml AMD	174,5	38,0
	Kerne mit DNase I (10µg/ml) präinkub.	0,5	0,1
	- ATP, -CTP, -GTP	0.3	0,06
gesunden Kartoffel- zellen	---	257,1	56,0

"---": keine Variation

3.5.4. Analyse der von isolierten Zellkernen in vitro syntheti-
sierten RNA durch Gelelektrophorese und Autoradiographie

Die isolierten Kerne wurden, wie in Kap. 3.5.3. be-
schrieben, inkubiert und die Nukleinsäuren extrahiert und
gereinigt. Die so gewonnenen Nukleinsäuren bestanden aus
nicht radioaktiv markierter, im Kern zum Zeitpunkt der
Isolation vorhandener DNA und RNA und ³²P-markierter, im
isolierten Zellkern neu synthetisierter RNA. Zur Analyse

neusynthetisierter RNA durch Gelelektrophorese und Autoradiographie wurden drei verschiedene Verfahren angewandt.

3.5.4.1. Gelelektrophorese unter partiell denaturierenden Bedingungen.

Dazu wurden die Proben in TEB mit 8M Harnstoff aufgenommen, bei 70°C in einem 5% PAA-Gel mit 8M Harnstoff getrennt und das getrocknete Gel autoradiographiert (Abb. 27). Unter diesen Bedingungen wandern zirkuläres und lineares PSTV zusammen in einer Bande.



Abbildung 27:

Gelelektrophoretische Analyse der ^{32}P -markierten in vitro-Synthese-Produkte isolierter Zellkerne von Kartoffelzellen unter partiell denaturierenden Bedingungen. Autoradiogramm eines 5% Polyacrylamidgels mit 8M Harnstoff in TEB. Die Bahnen 1-4 enthalten ^{32}P -markierte, von Mononukleotiden abgetrennte in vitro Transkripte isolierter Zellkerne von PSTV-infizierten Kartoffelzellen nach unterschiedlicher Behandlung:

Bahn 1: die Kerne wurden vor der Transkription mit DNase I behandelt und anschließend 2,5µg PSTV zugesetzt, Bahn 2: den Kernen wurde vor der Transkription 2,5µg PSTV zugesetzt, Bahn 3: die Kerne wurden vor der Transkription mit DNase I behandelt, Bahn 4: die Kerne wurden unbehandelt zur Transkription eingesetzt. Bahn 5 enthält 10ng ^{125}J -PSTV als Marker.

Bei den nicht mit DNase vorbehandelten Zellkernen ergaben sich durchgehende schwarze Bahnen über die gesamte Laufstrecke, es waren keine diskreten, einzelnen Banden zu erkennen. Das Zufügen von zusätzlicher PSTV RNA als Template hob die PSTV-Synthese weder in den unbehandelten noch in den mit DNase I vorbehandelten Kernen in eine mit diesem Verfahren nachweisbare Größenordnung an. Selbst wenn die PSTV RNA in die Zellkerne eingeschleußt worden wäre und auch von den dortigen RNA-Polymerasen als Template akzeptiert würde, bleibt doch die Neusynthese von PSTV unter der Nachweisgrenze. In den mit DNase vorbehandelten Kernen sind, wie schon bei den Untersuchungen zum Gesamteinbau von ^{32}P -UMP gefunden wurde (Tab. 6), keinerlei radioaktiv markierte Transkriptionsprodukte nachweisbar.

3.5.4.2. Gelelektrophorese unter voll denaturierenden Bedingungen.

Dazu wurden glyoxalierte Proben in 3.5% PAA-Gelen in 10mM Phosphatpuffer, pH 6.5 getrennt. Unter solchen Bedingungen wird zirkuläres von linearem PSTV getrennt. Bei diesen Versuchen wurde auch der Einfluß von alpha-Amanitin auf die Zusammensetzung der Transkriptionsprodukte untersucht. Auch hier ergab die Autoradiographie wieder das Muster heterogener polydisperser Nukleinsäuren ohne hervortretende definierte Banden.

Die Mehrheit der neusynthetisierten und radioaktiv markierten RNA wanderte im Bereich von Molekülen mit einer Kettenlänge von 800 bis 2000 Nukleotiden. Es konnten keine Unterschiede im Muster der Transkriptionsprodukte von gesunden und PSTV-infizierten Zellkernen festgestellt werden, vor allem traten in den Transkripten der PSTV-infizierten Zellkerne keine Banden auf der Höhe des PSTV-Markers hervor (Abb. 28).

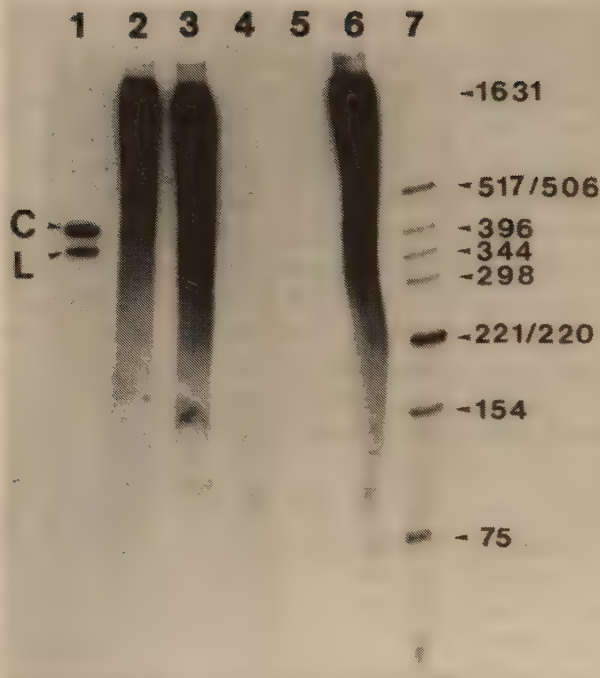


Abbildung 28:

Gelelektrophoretische Analyse der ^{32}P -markierten in vitro-Synthese-Produkte isolierter Zellkerne unter vollständig denaturierenden Bedingungen. Autoradiogramm eines 3,5% Polyacrylamidgels mit glyoxalierten Proben. Bahn 1 enthält 10ng ^{125}J -PSTV als Marker, die Bahnen 2-5 ^{32}P -markierte, von Mononukleotiden abgetrennte Transkriptionsprodukte isolierter PSTV-infizierter Zellkerne, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von alpha-Amanitin inkubiert wurden: Bahn 2: ohne Zusatz, Bahn 3: mit 10^{-8}M , Bahn 4: mit 10^{-6}M und Bahn 5: mit 10^{-4}M alpha-Amanitin. Bahn 6 enthält Transkriptionsprodukte gesunder Zellkerne und Bahn 7 HinfI-fragmentierte pBR 322 DNA als Längenmarker (vergl. Abb. 21 a).

Die Hemmung der in vitro Synthese in isolierten Kernen mit 10^{-8}M , 10^{-6}M und 10^{-4}M alpha-Amanitin ergab, daß bei 10^{-8}M alpha-Amanitin die Transkription kaum reduziert wurde, bei 10^{-6}M und 10^{-4}M alpha-Amanitin jedoch fast keine Synthese mehr stattfand (Abb. 28), daher wurde in den weiteren Versuchen zur Hemmung der RNA-Synthese alpha-Amanitin in einer Konzentration von 10^{-6}M eingesetzt. Dieses Ergebnis zeigte somit, daß der größte Anteil der Transkriptionsprodukte isolierter Zellkerne durch die alpha-Amanitin-sensitive RNA Polymerase II synthetisiert wurde.

3.5.4.3. Zweimalige Elektrophorese unter partiell denaturierenden und unter denaturierenden Bedingungen.

Dazu wurde aus einem partiell denaturierenden Gel, das wie unter 3.5.4.1. beschrieben, mit radioaktiv markierten Transkriptionsprodukten von Zellkernen beladen und elektrophoretisiert worden war, ein 1.5cm breiter Bereich, in dem sich der ^{125}J -PSTV-Marker befand, ausgeschnitten und in ein 5% PAA-Gel mit 8M Harnstoff in 1/4 TEB einpolymerisiert. Dieses Gel wurde bei 37°C gefahren. Infolge des geringen Salzgehaltes (1/4 der ursprünglichen TEB-Konzentration) und der höheren Temperatur wird das zirkuläre Viroidmolekül weitgehend denaturiert und dadurch in seiner Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber den zellulären RNAs stark verzögert. Damit sollten sich die zirkulären PSTV-Moleküle von den schneller laufenden offenkettigen zellulären RNA-Molekülen trennen und als einzelne Bande erkennbar sein. Bei den Syntheseprodukten der Zellkerne war jedoch auch mit diesem Verfahren auf Höhe des ^{125}J -PSTV-Markers keine Radioaktivität nachweisbar (Abb. 29). Es spielte hierbei keine Rolle, ob den Transkriptionsansätzen PSTV zugesetzt wurde oder nicht. Die Behandlung mit DNase zerstörte wiederum die Voraussetzungen für die gesamte RNA-Synthese der Zellkerne.

Damit war klar geworden, daß mit den verhältnismäßig einfachen Methoden der Gelelektrophorese und Autoradiographie die Neusynthese von PSTV in isolierten Zellkernen nicht nachgewiesen werden konnte. Dieser Nachweis mußte also ebenfalls durch molekulare Hybridisierung geführt werden.

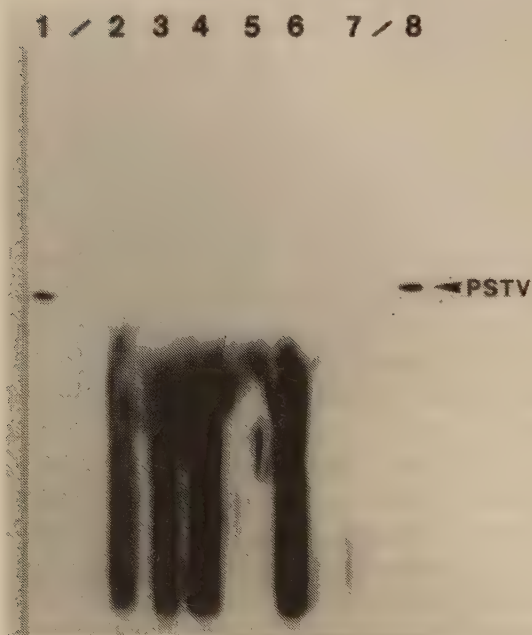


Abbildung 29:
Analyse ^{32}P -
markierter in
vitro-Synthese-
Produkte iso-
lierter Zellker-
ne durch zweima-
lige Gelelektro-
phorese. Die
Proben wurden
zunächst über
ein 5% Poly-
acrylamidgel mit
8M Harnstoff in
TEB bei 7°C ge-
trennt, der Vi-
roidbereich aus-
geschnitten, in
ein 5% Poly-
acrylamidgel mit

8M Harnstoff in 1/4 TEB einpolymerisiert und diesmal bei 37°C aufgetrennt. Das getrocknete Gel wurde dann autoradiographiert. Die Bahnen 1 und 8 enthalten 10ng ^{125}J -PSTV als Marker, die Bahnen 2-7 den PSTV-Bereich von ^{32}P -markierten Transkriptionsprodukten folgender Ansätze: Bahn 2: isolierte Zellkerne von PSTV-infizierter Zellen, denen vor der Transkription 5µg PSTV zugesetzt worden sind, Bahn 3 und 4: isolierte Zellkerne aus PSTV-infizier-

(Abb. 29, Fortsetzung)

ten Zellen ohne Zusatz, Bahn 5: Zellkerne, die vor der Transkription mit DNase I behandelt worden sind, Bahn 6: Zellkerne, denen vor der Transkription 2,5µg PSTV zugesetzt worden ist und Bahn 7: Zellkerne, die vor der Transkription mit DNase I behandelt worden sind und denen ebenfalls 5µg PSTV zugesetzt worden ist.

3.6. Nachweis der Neusynthese von PSTV in isolierten Zellkernen durch Hybridisierung der in vitro Transkriptionsprodukte gegen Membran-gebundene PSTV-Sequenzen

Um neusynthetisiertes PSTV durch molekulare Hybridisierung nachzuweisen, wurde folgende Strategie entwickelt: Da nach der in vitro-Transkription in den RNA-Extrakten aus den Zellkernen neusynthetisiertes und damit radioaktiv markiertes PSTV neben dem in den Zellkernen schon akkumulierten, nicht radioaktiv markierten PSTV vorlag, konnte die Hybridisierung nur so durchgeführt werden, daß die gesamten RNA-Extrakte als Hybridisierungsprobe gegen filtergebundene, nicht radioaktiv markierte PSTV-spezifische Nukleinsäuresequenzen benutzt wurden. Dies mußte unter so stringenten Hybridisierungsbedingungen durchgeführt werden, daß der in den Extrakten zu erwartende geringe Anteil an PSTV RNA ein klares Hybridisierungssignal abgab, während die große Masse radioaktiver zellulärer RNA-Sequenzen nicht gebunden werden durfte. Dazu wurden in mehreren Schritten die optimalen Hybridisierungsbedingungen und die für den filtergebundenen Nachweis am besten geeigneten PSTV-spezifischen Nukleinsäuren ermittelt.

3.6.1. Ermittlung der optimalen Hybridisierungsbedingungen mit ^{32}P -markierten Zellkern-Transkriptionsprodukten als Hybridisierungsprobe

Um die Temperatur festzustellen, bei der nur noch spezifische PSTV-Hybride stabil sind, wurde im Bereich zwischen 65°C und 80°C in 5°-Intervallen die Hybridisierungstemperatur variiert. Als PSTV-spezifische Probe wurde gereinigte PSTV(+)RNA verwendet, als Kontrollen RNA-Extrakte aus PSTV-infizierten und gesunden Kartoffelzellen. Diese Nukleinsäurepräparationen wurden unter vollständig denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch getrennt, geblottet und mit den ^{32}P -markierten Syntheseprodukten von gesunden und von PSTV-infizierten Kernen bei 65°C, 70°C, 75°C und 80°C hybridisiert (Abb. 30). Bei 65° und 70°C hybridisierten sowohl die Syntheseprodukte von gesunden als auch die von infizierten Zellkernen völlig unspezifisch mit der gesamten membranfixierten RNA von gesunden und infizierten Zellen (Abb. 30 a und b). Bei diesen Temperaturen ist die Hybridisierung also völlig unspezifisch. Erst bei 75° und 80°C erfolgte nur noch eine Hybridisierung der Probe von infizierten Zellkernen mit der matrixgebundenen gereinigten PSTV(+)RNA (Abb. 31 c und d, Bahn 6). Der PSTV-Anteil in der filtergebundenen RNA aus den infizierten Zellen war vermutlich zu gering, um visualisiert werden zu können (Abb. 30 c und d, Bahn 4).

Bei diesen hohen Temperaturen sind aber nur die PSTV-Hybrid-Komplexe stabil, die vollständig komplementär sind. Demnach müssen die mit dem (+)PSTV-Marker nachgewiesenen Syntheseprodukte (-)Polarität haben. Dieser Versuch brachte also zwei Ergebnisse:

- 1.) Für einen spezifischen Nachweis von neusynthetisierten und damit radioaktiv markierten PSTV-Sequenzen ist eine Hybridisierungstemperatur von mindestens 75°C erforderlich, bei der allerdings mit Membran-gebundener PSTV(+)RNA nur PSTV(-)RNA nachgewiesen werden kann.
- 2.) In isolierten Zellkernen wird während 30 min Inkuba-

tion PSTV(-)RNA in nachweisbaren Mengen synthetisiert.

Für den Nachweis der Neusynthese von (+)PSTV mit diesem Verfahren müssen (-)PSTV-Sequenzen an der Membran gebunden sein. Die Möglichkeit, PSTV(+)Sequenzen durch filtergebundene PSTV(+)RNA bei weniger stringenten Bedingungen zu erfassen, wie in Kap. 3.4. beschrieben, besteht hier nicht, da die starke unspezifische Hybridisierung des Überschusses an zellulärer, radioaktiver RNA den Nachweis verfälschen würde.

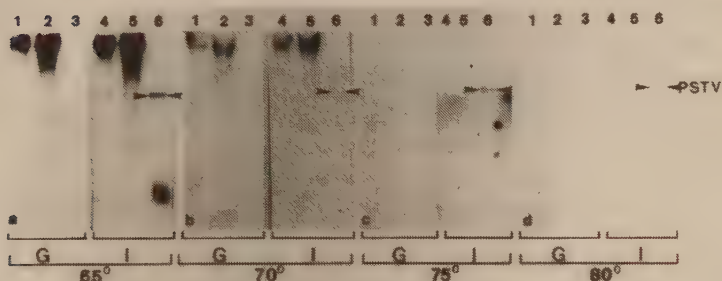


Abbildung 30:

Einfluß der Hybridisierungstemperatur auf den spezifischen Nachweis von neusynthetisiertem PSTV in ^{32}P -markierten in vitro-Transkriptionsprodukten isolierter Zellkerne. Autoradiogramm der "Northernblots" von 3,5% Polyacrylamidgelelen, auf denen die folgenden Nukleinsäureproben aufgetrennt waren (vergl. Legende von Abb. 18): Bahnen 1 und 4: RNA aus 1×10^6 PSTV-infizierten Kartoffelzellen, Bahnen 2 und 5: RNA aus 1×10^6 gesunden Kartoffelzellen und Bahnen 3 und 6: 10ng gereinigtes PSTV. Die "Blots" wurden hybridisiert mit ^{32}P -markierten in vitro Transkriptionsprodukten von isolierten gesunden Zellkernen (G, jeweils Bahnen 1-3) und PSTV-infizierten Zellkernen (I, jeweils Bahnen 4-6) bei 65° (a), 70° (b), 75° (c) und 80°C (d).

3.6.2. Nachweis der RNA-Natur der in vitro Transkriptionsprodukte

Um zu testen, ob es sich bei den in vitro ^{32}P -markierten PSTV-spezifischen Nukleinsäuren tatsächlich um RNA handelt, wurden die Syntheseprodukte von gesunden und PSTV-infizierten Zellkernen halbiert und jeweils eine Hälfte mit 0.43mol/l NaOH behandelt. Eine Probe ^{125}J -PSTV wurde als Kontrolle ebenfalls NaOH-behandelt und sämtliche Proben zusammen mit tRNA als Carrier gefällt und als Hybridisierungsprobe gegen Membran-fixierte RNA aus gesunden und PSTV-infizierten Kartoffelzellen (Abb. 31, Bahn 1 und 2), tRNA aus Escherichia coli (Bahn 3) und gereinigtes PSTV (Bahn 4) bei 55°C eingesetzt. Unter diesen wenig stringenten Bedingungen bei 55°C ergaben sowohl die Hybridisierungsproben von gesunden Zellkernen als auch die von PSTV-infizierten ein Hybridisierungssignal mit PSTV, vor allem war aber eine unspezifische Hybridisierung mit der membranfixierten RNA von E.coli zu beobachten (a und c, Bahn 3). Mit der sRNA aus gesunden und PSTV-infizierten Kartoffelzellen konnte in diesem Versuch keine Hybridisierung nachgewiesen werden (Bahn 1 und 2). Mit den Alkali-behandelten Proben trat in allen drei Fällen keine Hybridisierung auf ("Blots" b, d und f), nur mit den unbehandelten Proben erfolgte eine Hybridisierung. Somit war klar, daß die radioaktiv markierten Syntheseprodukte tatsächlich RNA sind, da DNA von NaOH nicht angegriffen würde.

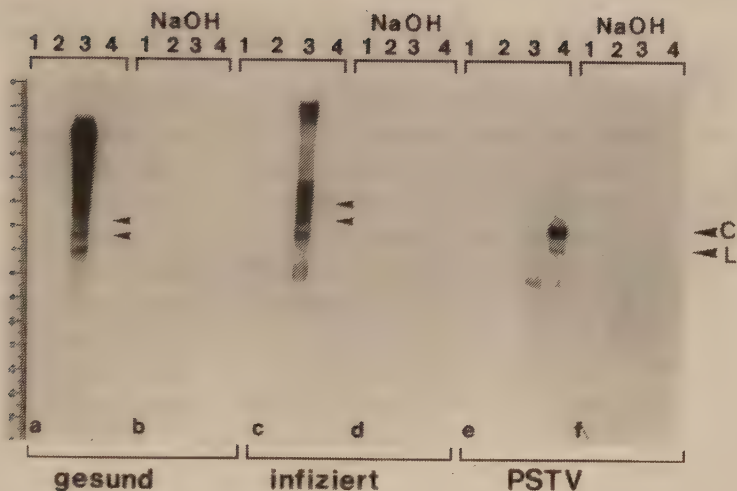


Abbildung 31:

Nachweis der RNA-Natur der ^{32}P -markierten in vitro-Transkripte isolierter Zellkerne. Autoradiogramm der "Northernblots" von 3,5% Polyacrylamidgelen, auf denen folgende RNA-Proben aufgetrennt waren (vergl. Legende von Abb. 18): Bahn 1: RNA aus 1×10^6 gesunden Kartoffelzellen, Bahn 2: RNA aus 1×10^6 PSTV-infizierten Kartoffelzellen, Bahn 3: 100ng RNA aus *E. coli* und Bahn 4: 10ng gereinigtes PSTV. Die "Blots" wurden hybridisiert mit ^{32}P -markierten in vitro-Transkriptionsprodukten von isolierten gesunden Zellkernen ("Blot" a und b) und PSTV-infizierten Zellkernen ("Blot" c und d) und mit ^{125}J -PSTV ("Blot" e und f) bei 55°C . Die Hybridisierungsproben wurden vor der Hybridisierung geteilt und je eine Hälfte mit NaOH behandelt ("Blots" b, d und f).

3.6.3. Nachweis von (+) und (-)PSTV-Sequenzen in den ³²P-markierten Syntheseprodukten isolierter Zellkerneim "Dot-Blot"-Verfahren

Der spezifische Nachweis von neusynthetisiertem PSTV in den Transkriptionsprodukten isolierter Zellkerne erfordert, wie unter 3.6.1. gezeigt wurde, außergewöhnlich stringente Hybridisierungsbedingungen. Deshalb ist es mit diesem Verfahren nicht möglich, PSTV(+)RNA, die als hochgereinigtes PSTV ja jederzeit zur Verfügung stand, als Probe zum Nachweis von neugebildeten PSTV(+)RNA Molekülen zu verwenden. Dazu mußten Proben mit PSTV(-)Polarität eingesetzt werden, die durch die Klonierung von PSTV im Bakteriophagen M 13 als einzelsträngige DNA inzwischen erhalten worden war und von Herrn Dipl. Chem. Martin Tabler freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Da auch einzelsträngige PSTV(+)DNA in verschiedenen Längen bereitstand, konnte der Nachweis von (+)PSTV und (-)PSTV in den Transkriptionsprodukten isolierter Kerne simultan mit Hilfe dieser einzelsträngigen PSTV DNA mit (-) bzw. (+)Polarität erfolgen. Die PSTV-spezifischen DNAs wurden im "Dot-Blot"-Verfahren auf die GST Membran aufgebracht. Dieses Verfahren konnte durchgeführt werden, weil unter den ermittelten Hybridisierungsbedingungen ausschließlich PSTV-spezifische Hybridisierungen möglich sind.

Außer den verschiedenen PSTV DNA-Molekülen, in denen die PSTV-Sequenz mehrmals aneinandergereiht enthalten ist ((+)PSTV: 1, 2- und 4-fach, (-)PSTV: 1-fach), wurde auch hochgereinigte PSTV RNA an die Membran fixiert.

Zur Kontrolle der Spezifität der Hybridisierungsbedingungen wurden nochmals die ³²P-markierten Produkte isolierter Kerne von gesunden und PSTV-infizierten Zellen als Hybridisierungsprobe eingesetzt. Mit der gesunden Kontrolle erfolgte erwartungsgemäß keine Hybridisierung (Abb. 32, "Blot" 2), während die Transkriptionsprodukte von PSTV-infizierten Kernen deutliche Hybridisierungssignale ergaben (Abb. 32, "Blot" 1). Die Hybridisierung zeigte,

daß um ein Vielfaches mehr PSTV(+) als PSTV(-)-Produkte synthetisiert werden, der Fleck, der die gebundenen (-)PSTV-Sequenzen enthielt, also die (+)Produkte "herausfischt", zeigte nach der Autoradiographie eine kräftige Schwärzung. Dagegen konnten PSTV(-)RNA-Produkte nur mit der PSTV(+)DNA der vierfachen Länge ((++++DNA) als relativ schwaches Signal nachgewiesen werden (Abb. 32, "Blot" 1), während mit der gereinigten PSTV(+)RNA und mit den PSTV(+)DNAs mit einfacher und doppelter Länge keine Hybridisierung feststellbar war.

Der Unterschied der Schwärzung bei den PSTV(+)DNAs mit unterschiedlicher Anzahl Einheitslängen ist wohl auf die unterschiedliche Menge an PSTV-Sequenzen auf der Membran zurückzuführen, da bei gleicher Menge aufgetragener DNA das klonierte Stück mit der 4fachen PSTV-Sequenz natürlich eine entsprechend größere Anzahl an verfügbaren Bindestellen enthält als die beiden anderen. Es wurde daher in allen weiteren Versuchen die PSTV(++++DNA eingesetzt. Für den Nachweis von PSTV(+)RNA stand nur DNA mit einfacher und doppelter (-)PSTV-Sequenz zur Verfügung, die jedoch bei der großen Menge an PSTV(+)RNA-Produkten keine beobachtbaren Intensitätsunterschiede bei den Signalen ergaben. Daher wurde im weiteren Verlauf der Versuche die PSTV(-)DNA mit der einfachen PSTV-Sequenz benutzt.

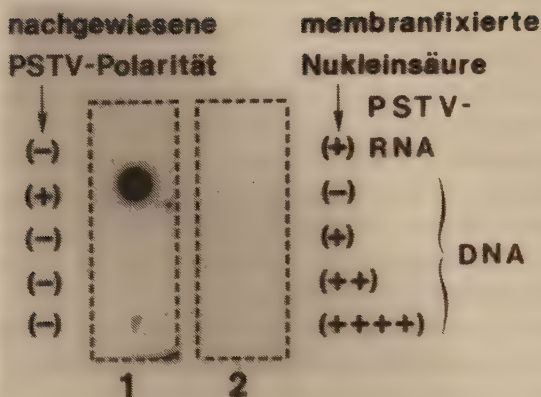


Abbildung 32:

Nachweis von neusynthetisierten und damit radioaktiv markierten PSTV(+) und (-)RNA Molekülen in den Syntheseprodukten isolierter Zellkerne. Autoradiogramm eines Hybridisierungsexperiments mit radioaktiv markierten Transkriptionsprodukten isolierter Zellkerne gegen PSTV(+)RNA und PSTV-spezifische DNAs, die im "Dot-Blot" Verfahren an GST Membranen gebunden worden waren. Hybridisiert wurde bei 75°C mit in vitro Transkripten isolierter Zellkerne aus PSTV-infizierten ("Blot" 1) und gesunden ("Blot" 2) Kartoffelzellen. Die einzelnen Flecke enthalten von oben nach unten folgende membranfixierte Nukleinsäure-Proben: 10ng gereinigtes PSTV, jeweils 700ng einer in M 13 klonierten einzelsträngigen DNA mit einer PSTV-komplementären DNA-Sequenz einfacher Einheitslänge ((-)DNA), sowie jeweils mit einer PSTV-entsprechenden DNA-Sequenz eines M 13-Klons von einfacher ((+)DNA), doppelter ((++)DNA) und vierfacher ((++++DNA) Einheitslänge.

3.6.4. Voraussetzungen für die PSTV-Synthese in isolierten Zellkernen

Ein Maß für die Menge neusynthetisierter PSTV-Sequenzen ist die Intensität der Hybridisierungssignale, die anhand der Original-Autoradiogramme densitometrisch bestimmt wurde. Analog den Bedingungen für die Gesamt-RNA-Synthese (Kap. 3.5.) wurde untersucht, inwieweit die Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten oder die Präinkubation der Zellkerne mit DNase I die PSTV-Synthese beeinflusst (Abb. 33).

Wurden den Transkriptionsansätzen außer dem ^{32}P -markierten UTP keine weiteren Nukleosidtriphosphate zugesetzt, fand in den isolierten Zellkernen im Vergleich zu den Kontrollen, die alle Triphosphate enthielten, fast keine PSTV-Synthese mehr statt (Abb. 33, "Blot" 3).

Geht man davon aus, daß das Viroid von den zelleigenen DNA-abhängigen RNA Polymerasen repliziert wird, so ist es wichtig festzustellen, welchen Einfluß die als Template konkurrierende nukleäre DNA auf die PSTV-Synthese hat. Deshalb wurden die Kerne 30min bei 29°C mit DNase I vorinkubiert, so daß im Transkriptionsansatz kaum noch vollständiges DNA-Template vorhanden war, was die Synthese zelleigener RNA ja völlig zum Erliegen bringt (vergl. Kap. 3.5.3., Tab.6). Interessanterweise wurde dadurch die Synthese von (+) und (-)PSTV-Sequenzen jeweils drastisch reduziert (Abb. 33, "Blot" 2). Durch densitometrische Vermessung der Schwärzung auf dem Autoradiogramm ließ sich der Effekt der unterschiedlichen Variationen quantitativ abschätzen (Tab. 7).

**nachgewiesene
PSTV-Polarität**

**membranfixierte
Nukleinsäure**

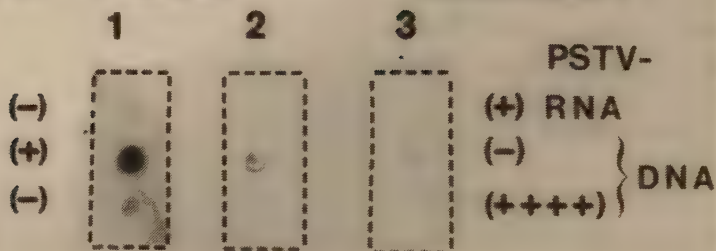


Abbildung 33:

Voraussetzungen für die Synthese von PSTV(+) und PSTV(-)RNA. Autoradiogramm von "Dot Blots" mit fixierter PSTV(+)RNA und PSTV-spezifischen einzelsträngigen DNAs, hybridisiert bei 75°C mit in vitro Transkripten isolierter Zellkerne aus PSTV-infizierten Kartoffelzellen. "Blot" 1: Hybridisierung mit Transkripten unbehandelter Kerne im Standardansatz, "Blot" 2: mit Transkripten von Kernen, die vor der Transkription mit DNase I behandelt wurden, "Blot" 3: Hybridisierung mit Transkripten unbehandelter Kerne, wobei dem Ansatz außer alpha-³²P-UTP keine nicht markierten Nukleosidtriphosphate zugesetzt worden waren. Die "Blots" enthalten von oben nach unten folgende membranfixierte Nukleinsäure-Proben: 10ng gereinigte PSTV(+)RNA, 700ng M 13-klonierte einzelsträngige DNA mit einer PSTV-komplementären Sequenz einfacher Einheitslänge (-) und 700ng M 13-klonierte DNA mit einer PSTV-entsprechenden Sequenz vierfacher Einheitslänge (++++).

Tabelle 7:

Hemmung der Synthese von (+)PSTV und (-)PSTV in isolierten Zellkernen aus PSTV-infizierten Kartoffelzellen durch Behandlung mit DNase I und Entzug der Nukleosidtriphosphate

Behandlung	Synthese von	
	PSTV(+)RNA	PSTV(-)RNA
	(Prozent vom Kontrollwert)	
Zellkerne präinkub. mit 10µg/ml DNase I	31,7%	30,5%
RNA-Synthese nur in Anwesenheit von ³² P-UTP ohne ATP, CTP und GTP	15,0%	12,2%

Die Prozentwerte wurden durch densitometrische Messung der Schwärzung der einzelnen Flecke ermittelt.

Es zeigte sich, daß die Synthese von (+) und (-)PSTV gleichermaßen beeinflußt wurde. Die Zerstörung des Chromatins im Zellkern durch die DNase-Behandlung führte zu einer Reduktion auf etwa ein Drittel der ursprünglichen Synthese, während das Weglassen der nicht markierten Nukleosidtriphosphate sogar eine Reduktion der PSTV-Synthese um ca. 85% zur Folge hatte. Daraus konnte erstens gefolgert werden, daß die in vitro Synthese von (+) und (-)PSTV auf einer echten, von allen Nukleosidtriphosphaten abhängigen Transkription beruht. Zweitens machte dieser Versuch deutlich, daß die Zerstörung des natürlichen DNA-Templates durch DNase die in die Viroid-Synthese involvierten Polymerasen so nachhaltig beeinträchtigt, daß die Transkription dieses fremden RNA-Moleküls stark gehemmt ist.

3.6.4.1. Hemmung der PSTV-Synthese durch alpha-Amanitin und Actinomycin D

Zur Untersuchung der Frage, welche der im Kern lokalisierten, DNA-abhängigen RNA-Polymerasen (pol I, pol II, pol III) an der Synthese von (+) und (-)PSTV beteiligt sein könnten, wurde den Transkriptionsansätzen alpha-Amanitin und Actinomycin D zugesetzt.

Grundlage dafür ist die Tatsache, daß die Polymerasen sich in ihrer Sensibilität gegen alpha-Amanitin unterscheiden (JENDRISAK, 1980) und Actinomycin D ihre Transkriptionskomplexe unterschiedlich stark stört (REICH und GOLDBERG, 1964; GOESSENS, 1984). Pol I ist alpha-Amanitin-resistent, pol II bei 10^{-6} M alpha-Amanitin zu 95% und pol III zu 40% gehemmt (JENDRISAK, 1980), die Transkriptionseinheit der pol I ist schon bei sehr niederen Actinomycin D-Konzentrationen gestört, während bei pol II und pol III dafür höhere Konzentrationen nötig sind (REICH und GOLDBERG, 1964).

Die Synthese von (+) und (-)PSTV wurde von 10^{-6} M alpha-Amanitin gleichermaßen gehemmt (Abb. 34, "Blot" 2), die densitometrische Messung der Schwärzung des Autoradiogramms nach der Hybridisierung ergab für (+)PSTV und (-)PSTV-Synthese jeweils einen um etwa 85% geringeren Wert als bei der ungehemmten Kontrolle (Tab. 9), dies liegt in der Größenordnung der Hemmung der Gesamtsynthese, die 94% betrug (vergl. Tab. 6).

Tabelle 8:

Einfluß von alpha-Amanitin und Actinomycin D auf die in vitro-Synthese von (+) und (-)PSTV in isolierten Zellkernen aus PSTV-infizierten Kartoffelzellen.

Hemmstoffzusatz	Synthese von	
	PSTV(+)RNA	PSTV(-)RNA
	(Prozent vom Kontrollwert)	
10^{-6} mol/l alpha-Am.	17,7%	16,2%
+10µg/ml AMD	34,5%	89,8%

Die Prozentwerte wurden durch densitometrische Messung der Schwärzung der einzelnen Flecke ermittelt.

Anders bei der Hemmung durch Actinomycin D. 10µg/ml Actinomycin D hemmen die (+)- und (-)PSTV-Synthese unterschiedlich stark (Abb. 34, "Blot" 3). Wie Tabelle 9 zeigt, ist die Synthese von (+)PSTV um etwa 65%, die (-)PSTV-Synthese jedoch nur zu etwa 10% reduziert. Dies ist ein erster wichtiger Hinweis darauf, daß an der Replikation von PSTV offensichtlich mindestens zwei verschiedene RNA Polymerasen beteiligt sind, die unterschiedlich sensitiv gegenüber Actinomycin D reagieren.

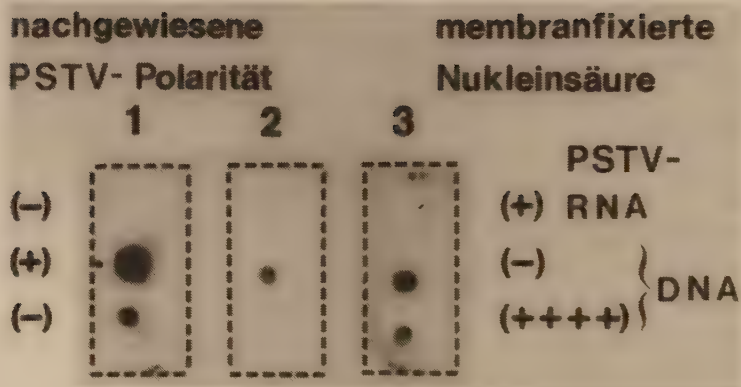


Abbildung 34:

Einfluß von α -Amanitin und Actinomycin D auf die *in vitro*-Synthese von (+) und (-)PSTV in solierten Zellkernen PSTV-infizierter Kartoffelzellen. Autoradiogramm von "Dot Blots", hybridisiert bei 75°C mit den *in vitro*-Transkriptionsprodukten der Zellkerne: "Blot" 1: Hybridisierung mit Transkripten aus einem Standardansatz mit unbehandelten Kernen, "Blot" 2: mit RNA aus einem Transkriptionsansatz mit $10^{-6}M$ α -Amanitin und "Blot" 3: mit RNA aus einem Ansatz mit 10µg/ml Actinomycin D. Die "Blots" enthalten von oben nach unten folgende membranfixierten Proben: 10ng gereinigtes PSTV, 700ng M 13-klonierter einzelsträngiger DNA mit einer PSTV-komplementären Sequenz (-) und 700ng M 13-klonierter DNA mit PSTV-entsprechender Sequenz vierfacher Einheitslänge (++++).

Die Ergebnisse dieser verschiedenen Experimente zeigen ganz eindeutig, daß die Synthese sowohl von (-)PSTV als auch von (+)PSTV und damit die gesamte PSTV-Replikation im Zellkern stattfindet. Die unterschiedlichen Befunde der Hemmstoffversuche mit alpha-Amanitin und Actinomycin D weisen außerdem darauf hin, daß verschiedene nukleäre Polymerasen an diesem komplexen Prozeß beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte die aufgrund früherer, indirekter Befunde formulierte Hypothese, daß der Zellkern als Ort der Viroidreplikation wahrscheinlich sei (DIENER, 1971; TAKAHASHI und DIENER, 1975; SÄNGER, 1972; MÜHLBACH und SÄNGER, 1979; RACKWITZ et al., 1981) auf zwei voneinander unabhängigen Wegen experimentell bestätigt werden.

1. Die als Intermediär-Formen der Viroidreplikation postulierten und aus infiziertem Pflanzenmaterial bereits nachgewiesenen PSTV(-)RNA Moleküle (GRILL und SEMANCIK, 1978; ROHDE und SÄNGER, 1981; BRANCH et al., 1981; OWENS und DIENER, 1982; ZELCER et al., 1982; MÜHLBACH et al., 1983) konnten in RNA aus gereinigten Kernen nachgewiesen werden. Dabei traten zahlreiche Oligomere bis zu etwa vierfacher Einheitslänge auf. Zusätzlich wurden in den isolierten Kernen zwei verschieden lange PSTV(+)Oligomere von etwa zwei- und dreifacher Einheitslänge entdeckt, die als Vorstufen für das reife, zirkuläre PSTV betrachtet werden müssen. Alle Viroid-Formen sind nicht oder nur in Spuren im cytoplasmatischen Überstand zu finden. Die in den Zellkernen nachgewiesenen PSTV(+)Oligomeren sind den in mit Avocado Sunblotch Viroid (ASBV) und Coconut "cadang cadang" Viroid (CCCV) infizierten Pflanzen gefundenen (+)Oligomeren ähnlich. Die intrazelluläre Lokalisation dieser Viroide ist allerdings im Gegensatz zu den Viroiden der PSTV- und HSV-Gruppe nicht nukleär, sondern mit den Chloroplasten (ASBV) und/oder dem Cytoplasma (CCCV) assoziiert (RANDLES et al., 1976; MOHAMED und THOMAS, 1980).

2. Es konnte gezeigt werden, daß die isolierten Zellkerne in vitro sowohl (+) als auch (-)PSTV-Sequenzen synthetisieren. Dieser Nachweis erfolgte durch molekulare Hybridisierung der Syntheseprodukte an membranfixierte (-) und (+)PSTV DNA und unterscheidet sich somit grundlegend von den bis dahin geführten Nachweisen, die die Viroidspe-

zifität neusynthetisierter RNA lediglich mit deren gelelektrophoretischer Komigration mit dem PSTV-Marker unter nicht vollständig denaturierenden Bedingungen begründeten (TAKAHASHI und DIENER, 1975; FLORES und SEMANCIK, 1982).

4.1. Zellkernisolation und -charakterisierung

Für die Zellkernisolation wurde eine Methode angewandt, die für die Kernisolation aus Suspensionskulturen von Tabak entwickelt worden war (WILLMITZER und WAGNER, 1982) und sich wesentlich von anderen unterschied, die bis zu diesem Zeitpunkt für die Kernisolation aus Pflanzenmaterial eingesetzt wurden (KUEHL, 1964; TAUTVIDAS, 1971; MASCARENAS et al., 1974; APP und GRANADOS, 1974; CHEN et al., 1975; MENNES et al., 1977; OKYAMA et al., 1977; MENNES et al., 1978; GROBMANN et al., 1979; GUILFOYLE, 1980). Nachdem sie im Hinblick auf die speziellen Erfordernisse der Kartoffelzellsuspension modifiziert worden war, führte diese Methode zu reinen Kernfraktionen, die im Zuge zweier Dichtezentrifugationsschritte von allen cytoplasmatischen Bestandteilen befreit worden waren: die gereinigte Kernfraktion zeigte bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung keine nichtnukleären Strukturen, die RNA-Extrakte aus diesen Kernen waren frei von 4S, 5S und ribosomaler RNA und die RNA-Synthese in Transkriptionsansätzen mit so gewonnenen Zellkernen war alpha-Amanitinsensitiv, was die Anwesenheit mitochondrialer und plastidärer Polymerasen ausschließt. Die Nukleinsäureextrakte und Syntheseprodukte dieser Kerne waren somit frei von extranukleären Komponenten und deren Einfluß und boten die Möglichkeit, Inhalte und Aktivitäten zu untersuchen, die absolut kerneigen waren.

4.2. Nachweis PSTV-spezifischer Sequenzen durch molekulare Hybridisierung mit ¹²⁵J-PSTV

Da aufgrund des dichten Bandenmusters, das sich nach der gelelektrophoretischen Trennung der vollständig denaturierten Kern-RNA ergab, keine sichere Unterscheidung gesunder und PSTV-infizierter Proben möglich war, wurden die PSTV-Sequenzen durch molekulare Hybridisierung selektiv nachgewiesen. Dies geschah zunächst mit ¹²⁵J-markiertem PSTV unter dem Aspekt, daß diese Moleküle aufgrund der hohen Selbstkomplementarität von PSTV sich auch mit den entsprechenden Bereichen von PSTV-Molekülen derselben, also (+)Polarität, zusammenlagern können. Dabei konnte man infolge der unterschiedlichen Temperaturstabilität der partiell komplementären PSTV(+)(+)- bzw. PSTV(-)(-)-Hybride und der vollständig komplementären und damit thermostabileren PSTV(+)(-)-Hybride (ROHDE und SÄNGER, 1981) bis zu einem gewissen Grad unterscheiden, welche der nachgewiesenen Sequenzen (+)- und welche (-)-Polarität haben.

Die Tatsache, daß bei 42°C nur eine relativ schwache Hybridisierung stattfand, wobei das Bandenmuster innerhalb der Bahnen dafür sprach, daß sich Hybride aus Strängen gleicher und aus Strängen entgegengesetzter Polarität gebildet hatten, ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß sowohl die membranfixierten als auch die als Hybridisierungsprobe frei diffundierenden ¹²⁵J-markierten PSTV-Moleküle bei dieser Temperatur größtenteils renaturierten und intramolekular hybridisierten, bevor es zu einer Begegnung zweier Moleküle und dadurch zu einer intermolekularen Hybridisierung kam. Bei 55°C scheint dieser Effekt weitgehend ausgeschaltet zu sein, es traten zahlreiche intensive Banden im Größenbereich oberhalb und unterhalb der Viroid-Einheitslänge und ganz besonders in der Position des zirkulären und linearen PSTV auf, die auf PSTV(+)(+)- und (+)(-)-Hybride zurückzuführen sind.

Bei 70°C waren nur noch die lückenlos komplementären Hybride aus Strängen entgegengesetzter Polarität stabil. Da es sich bei der ¹²⁵J-markierten PSTV-Hybridisierungsprobe fast ausschließlich um (+)-Stränge handelt, konnten bei dieser Temperatur nur (-)-Sequenzen nachgewiesen werden. Dies bestätigte sich in der Tatsache, daß der matrixgebundene PSTV-Marker, der, wie die ¹²⁵J-markierte Hybridisierungsprobe, fast ausschließlich (+)-Stränge enthält, nur ein sehr schwaches Signal verursachte. Auch in den PSTV-infizierten matrixfixierten Kernproben trat im Gegensatz zur 55°C-Hybridisierung auf Höhe des PSTV-Markers nur ausgesprochen schwache Banden auf. Unverändert stark war dagegen das Signal bei den RNA-Banden, die langsamer wanderten als zirkuläres und lineares PSTV. Hierbei muß es sich um multimere (-)PSTV Sequenzen handeln. So war zwar bei 70°C genau festzulegen, welche der Banden PSTV(-)-Sequenzen enthielten, jedoch ließ sich vor allem im Bereich der oligomeren PSTV-Moleküle nicht eindeutig entscheiden, welche der Banden bei 55°C zusätzlich vorhanden und somit von (+)-Polarität waren, wenn man von den beiden intensiven Banden des zirkulären und linearen monomeren Viroids absieht.

Unabhängig von der Schwierigkeit der (+) und (-)-Strang-Unterscheidung lieferte dieses Ergebnis schon die erste Bestätigung, daß der Zellkern der Ort der Viroidreplikation sein muß, da angenommen werden kann, daß sich Intermediärformen eines Synthesevorgangs nur dort befinden, wo die Synthese stattfindet. Der ebenfalls untersuchte cytoplasmatische Überstand, der während der Kernisolation anfällt, enthielt kaum PSTV und ergab vor allem für die oligomeren PSTV-Sequenzen kein Signal.

4.3. Selektiver Nachweis von PSTV(+) und PSTV(-)RNA durch molekulare Hybridisierung mit (+) bzw. (-)spezifischen, ³²P-markierten Oligodeoxyribonukleotiden

Für die detaillierte Untersuchung der in den isolierten Kernen enthaltenen (+)- und (-)PSTV-Sequenzen waren die synthetisierten und ³²P-markierten Oligodeoxyribonukleotide p14 I, p15 und p14 II die geeigneten Hybridisierungsproben. Die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen wurde an die Möglichkeiten der nur 14 bzw. 15 Nukleotide langen Stücke, die zu verschiedenen Bereichen des (+)Strangs (p14 I, p15) und des (-)Strangs (p14 II) komplementär sind, angepaßt. Das Temperaturoptimum erwies sich dabei als ziemlich eng und lag bei 41°C. Wurden 41°C überschritten, nahm die Hybridisierung ab, da die Thermostabilität der kurzen Hybride (14 bzw. 15 bp) zu gering war, lag die Temperatur unter 41°C, so kam der bereits beschriebene Effekt der Renaturierung der PSTV-Moleküle mehr und mehr zum Tragen, die Oligonukleotide konnten sich an die infolgedessen teilweise wieder doppelsträngigen PSTV-Moleküle nicht vollständig anlagern und dadurch keine stabilen Hybride bilden. Wurde die Temperatur exakt kontrolliert, so boten diese Proben die Möglichkeit, (+)- und (-)PSTV-Sequenzen in der RNA aus den Zellkernen getrennt nachzuweisen. Allerdings ist die Tauglichkeit dieser Hybridisierung auf die RNA-Extrakte aus Kernen beschränkt, da mit der rRNA, die in Extrakten aus ganzen Zellen in viel größerer Menge enthalten ist, unspezifische Hybridisierungen auftraten und dadurch vor allem im hochmolekularen Bereich keine eindeutige Aussage mehr gemacht werden konnte.

Mit diesen Hybridisierungsproben gelang es, in den Kernen, zusätzlich zu den intermediären PSTV(-)Oligomeren, die in RNA aus ganzen Pflanzen und verschiedenen Zellkulturen bereits nachgewiesen worden waren (GRILL und SEMANCIK, 1978; ROHDE und SÄNGER, 1981; BRANCH et al., 1981; OWENS und DIENER, 1982; ZELCER et al., 1982;

MÜHLBACH et al., 1983), PSTV(+)Oligomere von etwa zwei- und dreifacher Einheitslänge nachzuweisen. Diese Banden verursachten nur sehr schwache Signale, was die Annahme stützt, daß es sich um transiente Vorstufen des reifen PSTV handelt, das im Kern akkumuliert. Die PSTV(+)Oligomeren, Transkripte der PSTV(-)Oligomeren, haben vermutlich nur eine sehr geringe Lebensdauer, bis sie in die monomere Form überführt und zirkularisiert werden und sind infolgedessen nur in sehr geringen Mengen präsent.

Die PSTV-spezifischen Banden, die bei der Gelelektrophorese schneller wandern als das Monomere und somit kleinere Ketten enthalten, sind mit großer Wahrscheinlichkeit spezifische PSTV-Bruchstücke, die während der doch relativ zeitaufwendigen Prozedur der Kernisolation entstehen. Sie treten bei RNA aus ganzen Zellen, die sehr schnell und schonend extrahiert werden können, nicht auf. Eine starke zeitliche Raffung der Isolationsprozedur führte zu einer leichten Verringerung ihrer Menge. Außerdem traten in Kernen aus infizierten Tomatenpflanzen dieselben PSTV-Fragment auf. Diese Befunde stützen die Idee von verschiedenen "Sollbruchstellen" im PSTV-Molekül, die als erste angegriffen werden. Mit der Degradation der RNA während der strapaziösen Kernisolation ließe sich auch erklären, daß die in den Kernen nachgewiesenen (-)Oligomeren kürzer sind, als die aus ganzen Zellen, bei denen sogar die 7fache Viroidlänge gefunden wurde (MÜHLBACH et al., 1983).

4.4. RNA-Natur der verschiedenen (+) und (-)PSTV-Moleküle

Die Behandlung der Zellkern-RNA und damit der darin enthaltenen PSTV-RNA-Spezies mit verschiedenen Nukleasen führte zu Ergebnissen, die die bisherige Vorstellung vom Ablauf eines "rolling circle"-Mechanismus bei der (-)PSTV-Synthese stützen (BRANCH et al., 1981; OWENS und DIENER, 1982). Dabei wird angenommen daß eine RNA-Polymerase anhand des zirkulären (+)PSTV in mehreren "Umläufen" ein PSTV(-)RNA-Molekül von mehrfacher Einheitslänge synthetisiert.

siert. Es treten dadurch (-)Oligomere auf, die über Bereiche von mehr als 15 Basenpaaren als Doppelstrang vorliegen (nur dann können sie von RNase III abgebaut werden). Doppelsträngigkeit über so lange Bereiche ist bei PSTV nur zwischen Strängen unterschiedlicher Polarität möglich, so daß der beobachtete Abbau der PSTV(-)Oligomeren durch RNase III am ehesten dadurch erklärt wird, daß sie an einem komplementären Strang, vermutlich das zirkuläre (+)PSTV, von dem sie transkribiert wurden, angelagert sind. Diese Hypothese wird gestützt durch den Befund, daß durch RNase III besonders die RNA im Bereich größer als Einheitslänge angegriffen wurde, während im monomeren und kleineren Bereich die Banden weitestgehend erhalten blieben.

Im Gegensatz dazu werden die PSTV(+)Oligomeren von RNase III nicht abgebaut, sie liegen also offensichtlich nicht über längere Bereiche (>15bp) doppelsträngig vor. Danach müssen sie nach der Transkription ziemlich schnell von ihrem Template getrennt werden, eventuell dadurch daß sie von einem zweiten, nachfolgenden Polymerase-Molekül abgeschält werden. Die so entstandenen (+)PSTV-Oligomeren müssen dann nur noch auf Einheitslänge zugeschnitten und zirkularisiert werden. Man kann vermuten, daß dies durch Enzyme geschieht, die normalerweise am Splicing der Wirtszell-RNA beteiligt sind. Es wurde bereits in Gewebe höherer Pflanzen (Weizenkeim) (BRANCH et al., 1982; KIKUCHI et al., 1982) und in *Chlamydomonas* (KIKUCHI et al., 1982) eine RNA-Ligase gefunden, die in vitro lineare PSTV RNA zirkularisiert. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß ein vergleichbares Enzym auch in Wirtspflanzen von PSTV existiert.

4.5. In vitro-Synthese von PSTV in isolierten Zellkernen

Der zweite Weg, der beschritten wurde, um den Zellkern als Ort der Viroidreplikation nachzuweisen, führte ebenfalls zu eindeutigen Aussagen. Nachdem die in vitro-Synthesebedingungen ausgearbeitet, das heißt das Alter der zur Kernisolation benutzten Suspensionskulturen, die Testpufferzusammensetzung, RNase-Inhibition während der Transkription und Dauer der Inkubation optimiert waren, wurden die Syntheseprodukte der Kerne analysiert. Auch hier erwies es sich als nötig, den Nachweis PSTV-spezifischer Syntheseprodukte über die molekulare Hybridisierung zu führen, da die in vitro synthetisierte RNA von Zellkernen nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter vollständig denaturierenden Bedingungen heterodispers nahezu über die gesamte Laufstrecke verteilt war und keine PSTV-spezifischen Banden auftraten, wie es bei den radioaktiv markierten Syntheseprodukten ganzer Tomatenpflanzen (SÄNGER und RAMM, 1975), Tomatenmesophyllprotoplasten (MÜHLBACH und SÄNGER, 1977), Kartoffelkalluszellen (MÜHLBACH und SÄNGER, 1981) und Kartoffelsuspensionszellen (MÜHLBACH et al, 1983) der Fall ist. Dies hatte vermutlich seine Ursache in der kurzen Inkubationszeit von 30 min, in der die Kerne aktiv blieben. In dieser Zeit kann, im Gegensatz zu den mehrstündigen oder gar mehrtägigen Markierungszeiten der Zell- und Pflanzensysteme, kein reifes PSTV akkumulieren und die endogene RNA nicht vollständig prozessiert werden, so daß keine diskreten Banden auftreten. Der Nachweis von in vitro synthetisierten PSTV-Sequenzen durch molekulare Hybridisierung bietet darüberhinaus die Möglichkeit, (+)- und (-)spezifische Produkte getrennt nachzuweisen und ihre Beeinflussung durch Inhibitoren getrennt zu beobachten. Er unterscheidet sich somit grundlegend von den früher durchgeführten Versuchen (TAKAHASHI und DIENER, 1975; FLORES und SEMANCIK, 1982), die die in vitro synthetisierten Produkte kernreicher Fraktionen unter nicht vollständig denaturierenden Bedingungen auftrennten und

aus dem Auftreten einer radioaktiven Bande auf der Höhe des Viroidmarkers schlossen, daß es sich dabei um zirkuläres, in vitro synthetisiertes Viroid handelte. Beim momentanen Stand der Erkenntnisse ist jedoch zu vermuten, daß es sich nicht um reifes, zirkuläres Viroid mit (+)Polarität handelte, sondern um vom zirkulären (+)Strang nicht abgetrennte Stücke PSTV(-)RNA, die in vitro daran synthetisiert worden waren.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den hier untersuchten Transkriptionsprodukten isolierter, reiner Kerne aus Kartoffelsuspensionen und denen der kernreichen Fraktionen aus Blättern von Tomate (TAKAHASHI und DIENER, 1975) und Gynura (FLORES und SEMANCIK, 1982) besteht in der Größe der neusynthetisierten RNA. Während bei den früheren Arbeiten die Syntheseprodukte aus den kernreichen Fraktionen in erster Linie aus niedermolekularer RNA bestanden, ist der Hauptanteil der synthetisierten RNA bei den hier beschriebenen gereinigten Kartoffelzellkernen hochmolekular. Dies läßt sich neben der Qualität der isolierten Zellkerne auf die routinemäßig zugesetzten RNase-Inhibitoren zurückführen, deren Anwesenheit verhindert, daß die frisch synthetisierte RNA sofort wieder abgebaut wird.

4.6. Nachweis von (+) und (-)PSTV RNA in den in vitro-Transkripten isolierter Zellkerne durch molekulare Hybridisierung mit membranfixierter, M13-klonierter, einzelsträngiger PSTV(-) bzw. PSTV(+)DNA

Für den Nachweis der in vitro synthetisierten (+)- und (-)PSTV-Sequenzen wurde M13-klonierte, einzelsträngige PSTV-DNA von (+)- bzw. (-)Polarität im Dot Blot Verfahren auf eine Membran gebracht, fixiert und die ³²P-markierten Kerntranskripte als Hybridisierungsprobe eingesetzt. Diese Methode ermöglichte es erstmals, das Verhältnis von (+)- und (-)PSTV-Sequenzen in den Syntheseprodukten abzuschätzen. Es zeigte sich, daß (+)PSTV wesentlich

effizienter synthetisiert wird als (-)PSTV, was die Vorstellung von der Rolle der (-)PSTV-Moleküle als Replikationsintermediäre unterstützt.

Die im Vergleich dazu extensive (+)PSTV-Synthese kann auf zweierlei Weisen verursacht werden:

1. Unter der Voraussetzung, daß (+)- und (-)PSTV von derselben RNA-Polymerase synthetisiert werden, scheinen die (-)PSTV-Moleküle ein wesentlich besser geeignetes Template zu sein als (+)PSTV, wodurch wesentlich mehr (+)PSTV produziert wird.

2. Wenn am Viroidreplikationszyklus verschiedene Polymerasen beteiligt sind, so scheint diejenige, die die (+)PSTV-Synthese katalysiert, eine erheblich höhere Enzymaktivität zu haben.

4.7. Inhibition der in vitro-Synthese von (+) und (-)PSTV in isolierten Zellkernen

Die zweite Hypothese wird durch die Befunde aus den Hemmstoffversuchen unterstützt. Da TAKAHASHI und DIENER (1975) und FLORES und SEMANCIK (1982) bei der Untersuchung der Hemmung der PSTV-Synthese durch Actinomycin D widersprüchliche Ergebnisse erhielten, wurde die Frage der Actinomycin D-Sensibilität der PSTV-Synthese nochmals untersucht. Es zeigte sich, daß die (+)PSTV-Synthese von Actinomycin D deutlich gehemmt wurde, während die (-)PSTV-Synthese fast unbeeinflusst blieb. Dieser Befund stützt die These von der Beteiligung zweier verschiedener Polymerasen am Syntheseyklus. Es ist bekannt, daß die drei nukleären DNA-abhängigen RNA-Polymerasen sich in ihrer Sensibilität gegenüber Actinomycin D-bedingten Strukturveränderungen des Chromatins unterscheiden (REICH und GOLDBERG, 1964). RNA-Polymerase I, die im Nukleolus lokalisiert ist, wird schon von niedrigen Actinomycin D-Konzentrationen inhibiert, durch welche die nukleoplasmatischen RNA-Polymerasen II und III noch nicht beeinflusst sind (WIDNELL und TATA, 1964). Zieht man dies in Betracht, so ist es wahr-

scheinlich, daß die Actinomycin D-resistente Synthese von (-)PSTV von RNA-Polymerase II oder III katalysiert wird, während die Hemmung der Synthese von (+)PSTV durch Actinomycin D für die Beteiligung der nukleolären RNA-Polymerase I an diesem Schritt des Replikationszyklus spricht. Diese Interpretation würde auch mit der Beobachtung übereinstimmen, daß PSTV im Nukleolus akkumuliert (SCHUMACHER et al., 1983). Die Möglichkeit, daß eine direkte Interaktion zwischen PSTV und Actinomycin D für die beobachtete Hemmung verantwortlich ist, kann aufgrund von in vitro Experimenten mit den gereinigten Polymerasen I und II ausgeschlossen werden. In beiden Fällen wurde die RNA-Synthese mit isoliertem PSTV als Template von Actinomycin D-Konzentrationen bis zu 20 µg/ml nicht beeinträchtigt (persönliche Mitteilung von Dr. Smagovicz, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Viroidforschung).

Mit Actinomycin D läßt sich allerdings nicht zwischen pol II und pol III unterscheiden. Dagegen spricht die Hemmung der (+)- und (-)PSTV-Synthese durch 10^{-6} M alpha-Amanitin, einer Konzentration, die nur ausreicht, um Polymerase II vollständig zu hemmen, dafür, daß eher diese nukleoplasmatische RNA-Polymerase und nicht die RNA Polymerase III an der Viroidreplikation mitbeteiligt ist. Diese schon länger existierende Vorstellung basiert auf in vivo Studien an Protoplasten (MÜHLBACH und SÄNGER, 1979) und in vitro Studien mit gereinigter DNA-abhängiger RNA-Polymerase II (RACKWITZ et al., 1981).

4.8. Gegenwärtiges Modell der PSTV-Replikation

Faßt man all diese Daten zusammen, läßt sich nun eine wesentlich erweiterte und verfeinerte Hypothese zum Mechanismus der Viroidreplikation aufstellen. Danach bewerkstelligt die DNA-abhängige RNA Polymerase II im Nukleoplasma die Synthese von (-)PSTV und die DNA-abhängige RNA Polymerase I katalysiert im Nukleolus die (+)PSTV-Syn-

these. Wenn (+)PSTV von der nukleolären RNA-Polymerase I synthetisiert wird, so kann andererseits seine Hemmung durch alpha-Amanitin nur als Sekundäreffekt erklärt werden. Eine derartige Beeinträchtigung der Polymerase I-Aktivität wurde häufig in isolierten Zellkernen als Folge einer alpha-Amanitin-Vergiftung beobachtet (FAULSTICH, 1981). Man glaubt, daß die Polymerase I-Aktivität unter der Kontrolle nukleoplasmatischer Genprodukte steht, die als Strukturorganisatoren wirken, deren Fehlen nach der Hemmung der RNA-Polymerase II die Segregation der Nukleoli zur Folge hat. Die morphologische Integrität des Nukleolus ist jedoch für die Aktivität der RNA-Polymerase I absolut erforderlich (GOESSENS, 1984). Obwohl dieses Phänomen an Pflanzenzellkernen bisher nicht detailliert untersucht wurde, muß die Möglichkeit eines solchen Sekundäreffekts in Betracht gezogen werden. Diese Hypothese wird zusätzlich gestützt durch den Befund, daß die Degradation der Chromatinstruktur durch Präinkubation der Kerne mit DNase I zu einer drastischen Reduktion der (+)- und (-)-PSTV-Synthese führte.

Versucht man die bisherigen Erkenntnisse über die PSTV- und HSV-Gruppe zu einem Replikationsmodell für diese Viroide zusammenzufassen, so ergibt sich ein ziemlich komplexes Schema mit mehreren Möglichkeiten (Abb. 35), von denen bestimmte Prozesse und Wege aufgrund der bisher bekannten Daten als die wahrscheinlicheren erscheinen, jedoch noch nicht experimentell gesichert sind.

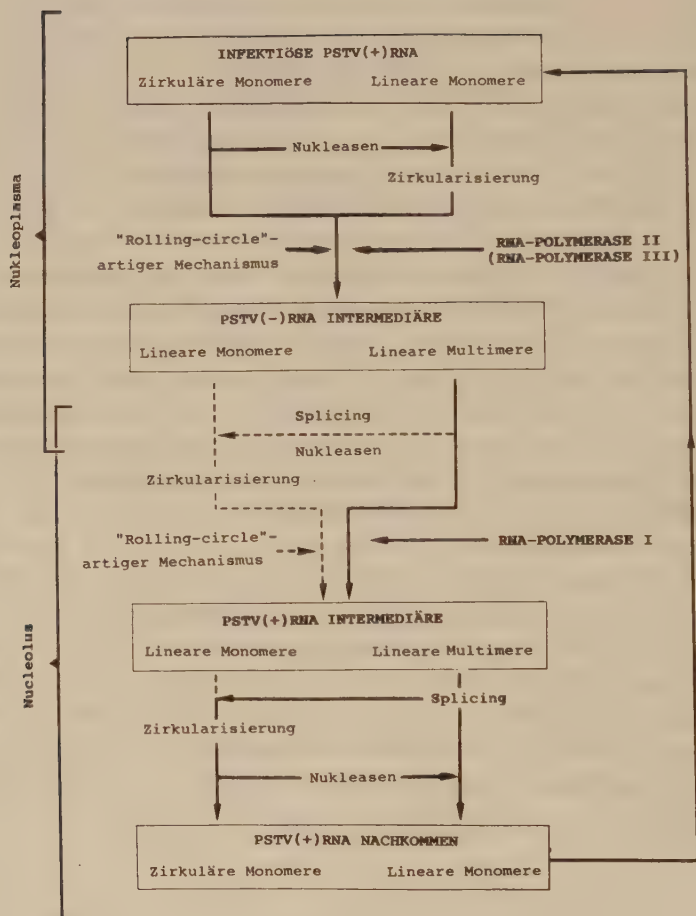


Abbildung 35:

Übersicht über die möglichen Wege der PSTV-Replikation nach dem bisherigen Stand der Erkenntnis.

Von den in Abbildung 35 gezeigten möglichen Abläufen erscheint beim momentanen Stand der Erkenntnisse folgender Weg am wahrscheinlichsten:

Die infektiösen zirkulären und linearen PSTV(+)RNA Monomeren treten in die Zelle ein und werden auf bisher nicht bekannte Weise in den Zellkern transportiert. Im Zellkern werden die PSTV(+)RNA Monomere in lineare PSTV(-) RNA Multimere transkribiert, ein Prozeß, an dem die nukleoplasmatische DNA-abhängige RNA Polymerase II offensichtlich beteiligt ist. Für diesen Schritt ist ein "rolling circle"-artiger Mechanismus vorgeschlagen worden, dessen molekulare und mechanistische Details experimentell noch nicht geklärt sind. Dieser Mechanismus würde voraussetzen, daß lineare PSTV(+)RNA Monomere, die ebenfalls infektiös sind (OWENS et al., 1977; SÄNGER et al., 1979), vor der Transkription zirkularisiert werden. RNA Ligasen, die lineares Viroid zirkularisieren, sind bereits aus Chlamydomonas und Weizenkeim isoliert worden (KIKUCHI et al., 1982; Branch et al., 1982). Es ist jedoch noch unklar, ob Splicing und Ligation enzymgesteuert oder ähnlich dem Prozeß von Self-splicing und Ligation der ribosomalen RNA von Tetrahymena (ZAUG et al., 1983) ablaufen.

Die multimeren PSTV(-)RNA Stränge werden dann von der nukleolären DNA-abhängigen RNA Polymerase I als Template akzeptiert und in multimere lineare PSTV(+)RNA Moleküle transkribiert. Zuletzt werden diese zu den monomeren linearen oder zirkulären Molekülen der "Nachkommenschaft" prozessiert, die im Nukleolus akkumulieren.

Alternativ dazu besteht die theoretische Möglichkeit, daß die PSTV(-)RNA Multimeren durch Splicing und Ligation zu zirkulären PSTV(-)RNA Monomeren prozessiert werden und diese in einem zweiten "rolling-circle"-artigen Mechanismus in multimere PSTV(+)RNA transkribiert und dann zu den linearen und zirkulären monomeren Endprodukten prozessiert werden. Es besteht jedoch bisher keine Evidenz für die Existenz zirkulärer PSTV(-)RNA Monomere.

Eine Überprüfung der hier vorgeschlagenen Hypothese zum Mechanismus der Viroidreplikation, nämlich daß zwei verschiedene DNA-abhängige RNA Polymerasen im Zellkern an der Synthese von PSTV(+) und PSTV(-)RNA beteiligt sind, ist sicher nur mit entsprechenden in vitro Transkriptionssystemen mit isolierten und hochgereinigten Polymerasen möglich. Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse vom komplexen Regulationsmechanismus eukaryontischer Transkriptionssysteme werden dabei nur rekonstituierte Präparationen verwendbar sein, die sämtliche, für eine korrekte Transkription erforderlichen Regulationsfaktoren enthalten. Nur dann können mit isolierten natürlichen oder synthetisierten PSTV(-) und PSTV(+)RNA Templates der verschiedenen möglichen Formen eindeutige Aussagen für oder gegen das vorgeschlagene Modell gemacht werden.

5. Material und Methoden

5.1. Verwendete Chemikalien

Sämtliche Chemikalien, die zur Verwendung kamen, entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad "pro analysi" und wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Merck bezogen. Für spezielle Zwecke wurden Reagenzien folgender Herkunft eingesetzt:

Amersham, Buchler GmbH & CoKG, Braunschweig:

gamma ^{32}P -(d)ATP spez. Akt. 3000Ci/mmol

alpha ^{32}P -UTP spez. Akt. 410Ci/mmol

5,6- ^3H -UTP in 50% wässriger Lösung, spez. Akt. 43,5Ci/mmol

New England Nuclear (NEN), Dreieich:

^{125}I odine

T 4 Polynukleotidkinase

Boehringer, Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim:

ATP, UTP, GTP, CTP

alpha-Amanitin

Actinomycin D

tRNA von E. coli MRE 600

5S RNA aus Kanichenleber

RNase A aus Rinderpankreas

Bethesda Research Laboratories (BRL):, Neu Isenburg:

Rinderserum Albumin (BSA), nuklease-frei

Vanadylribonukleosidkomplex (VRC)

Aurintricarbonsäure (ATA)

Formamid

RNase III

RNase H

RNase T₂

Serva Feinbiochemica, GmbH & Co, Heidelberg:

Heringssperm DNA

N,N,N',N', Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Morpholinoethansulfonsäure (MES)

Rinderserum Albumin (BSA)

Ethidiumbromid

Xylencyanol FF
Natriumdodecylsulphat (SDS)
Sigma Chemie GmbH, München:
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Spermin
Spermidin
Nonidet P 40
Bromphenolblau
May & Baker Ltd. (M&B), Dagenham, GB:
Hydroxystilbamidin (HSA)
Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg:
Percoll
Polyvinylpyrrolidon (PVP)
Ficoll 400
Calbiochem GmbH, Giessen:
Miracloth
GIBCO EUROPE, Gewebekulturen GmbH & CoKG, Karlsruhe:
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D)
Roth, Karlsruhe:
Acrylamid
Glycin
Rotiscint 22
Schweizer Seidengazefabrik AG, Thal, CH:
Siebtücher mit 132µm, 80µm und 20µm Porenweite
Yakult Pharmaceutical Industry Co., 8-21 Shingikan-Cho,
Nishinomiya, Japan:
Cellulase "ONOZUKA" R-10
Kinki Yakult MFG Co., 8-21 Shingikan-Cho, Nishinomiya,
Japan:
Macerozym R-10 (Pectinase)
Laborgeräte Vetter GmbH, Wiesloch:
Whatman 3MM
Whatman 540
Biotec, Madison USA:
RNasin

Miles GmbH, Frankfurt:

DNase I

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

N,N' Methylenbisacrylamid (Bis)

5.2. Zellkulturen

5.2.1. Kulturbedingungen

Für die Untersuchung an isolierten Kernen wurden Zellen aus Suspensionskulturen von Solanum demissum (PSTV-infiziert) und Solanum tuberosum (gesund) verwendet (die Anzucht von gesunden S. demissum-Zellen machte größte Schwierigkeiten und ist während des Verlaufs der Arbeit nicht in ausreichenden Mengen möglich gewesen). Sie wurden in thermostatisierten Schüttelschränken (Modell KF 4 der Firma Infors/Schweiz) im Dunkeln bei 26°C (S. demissum, PSTV-infiziert) und 21°C (S. tuberosum, gesund) im Kulturmedium "M240 2,4 D-1" gezüchtet. Die Zellsuspensionen wurden in gläsernen Kulturflaschen mit "Schikanen" (Einbuchtungen der Flaschenwand, dienen zur Verwirbelung des Mediums) in einem Volumen von etwa 125ml Medium gehalten und, angepaßt an ihre Verdopplungsrate, alle 7 Tage mit 125ml Medium verdünnt und auf zwei frische Kulturflaschen verteilt (FAUSTMANN und MÜHLBACH, 1983).

5.2.2. Kulturmedium

Das Kulturmedium "M 240 2,4D-1" bestand aus dem Basismedium "M 240" (LINSMAIER und SKOOG, 1965; modifiziert nach BEHNKE, 1975), dem der Wachstoffsstoff 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure (2,4D) $5 \times 10^{-6} \text{M}$ zugegeben wurde.

Das Basismedium "M 240" setzt sich folgendermaßen zusammen:

Salze:	mg/l:
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	450

Spurenelemente:

H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
KJ	0,75
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Fe (als Sequestren 330)	40

Organische Bestandteile:

Nicotinsäure	0,5
Pyridoxin-HCl	0,5
Naphthylelessigsäure (NAA)	5
Adeninsulfat	40
Saccharose	30000
Kokosnußmilch	25ml

Nach Zugabe des Wachstoffs 2,4D wurde das Medium mit 1N KOH bzw. 1N HCl auf pH 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

5.3. Zellkernisolation

Der Zellkernisolation aus S. demissum bzw. S. tuberosum Zellen lag eine von WILLMITZER und WAGNER (1981) für Tabakzellen entwickelte Methode zugrunde. Sie wurde den Erfordernissen der Kartoffelzellsuspension entsprechend optimiert (vergleiche Ergebnisse Kap. 3.2.3.). Um einen Vergleich beider Methoden zu ermöglichen, sind sie im nachfolgenden aufgeführt.

5.3.1. Kernisolation nach WILLMITZER und WAGNER (1981)

- 500g Zellen (3-6d nach dem Verdünnen, 3,5-41 Zellsuspension) wurden auf einem Siebtuch mit 130µm Porenweite filtriert und mit 4l Puffer A gewaschen
- 14 min bei Raumtemperatur (RT) in 3l Puffer A inkubiert
 - filtriert durch 130µm Siebtuch
 - 30 min inkubiert in Puffer B bei RT
 - filtriert durch 130µm Siebtuch
 - gewaschen mit 2l Puffer C (0-4°C, alle folgenden Schritte erfolgten mit gekühltem Puffer, auf Eis)
 - homogenisiert in 2l Puffer C + 2 Tropfen n-Octanol (als Antischaummittel) auf Eis mit einem Ultra Turrax (von Janke & Kunkel, IKA-Werk), 4x15 s bei maximaler Geschwindigkeit
 - filtriert durch Siebtücher mit 130µm, 80µm und 20µm Porenweite
 - zentrifugiert bei 2000g für 5 min ohne Bremse (Kontron-zentrifuge, Rotor A 6,9, 3300rpm)
 - Niederschlag suspendiert in Puffer C ad 60g
 - 70g Puffer D zugegeben
 - filtriert durch 20µm Siebtuch
 - zentrifugiert bei 1000g für 5 min ohne Bremse (Minifuge II von Heraeus Christ, Windkesselrotor, 2500rpm)
 - Überstand dekantiert und mit diesem die Zentrifugation sooft wiederholt, bis kaum noch Kerne im Niederschlag waren
 - Niederschläge gelöst in je 2-5ml Puffer C, vereinigt und mit Puffer C auf 20ml aufgefüllt
 - zentrifugiert bei 1000g für 5 min ohne Bremse in Minifuge II
 - Niederschlag mit Pasteur-Pipette gelöst in 20ml Puffer E pro ml Niederschlagsvolumen
 - zentrifugiert bei 5000g für 5 min ohne Bremse in Minifuge II (5500rpm)
 - schwimmende Kernlage abgesaugt und suspendiert in 20ml Puffer C

- zentrifugiert bei 1000g für 5 min ohne Bremse in Minifuge II
- Niederschläge dreimal gewaschen in Puffer C, beim letzten Durchgang mit definiertem Puffervolumen und in einer Hämatocytometer-Kammer gezählt (siehe Kap. 5.3.3.)
- gereinigte Kerne entweder aufgenommen in Puffer C mit 50% Glycerin (2Vol 5xC + 3Vol Aqua bidest + 5Vol Glycerin) für die Lagerung bei -20°C, später -80°C, oder extrahiert für die Nukleinsäureanalyse (siehe Kap. 5.6.).

Bei diesem Verfahren fanden die folgenden Pufferlösungen Verwendung:

Puffer A:

0,7M Mannit, 10mM MES, 5mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,1% BSA
eingestellt auf pH 5,8

Puffer B:

wie Puffer A + 0,01% Cellulase, 0,005% Pectinase
eingestellt auf pH 5,8

Puffer C:

0,25M Saccharose, 10mM MES, 5mM EDTA, 0,2mM PMSF, 10mM NaCl, 0,1% BSA, 0,15mM Spermin, 0,5mM Spermidin, 0,6% Nonidet P 40, 20mM Mercaptoethanol

Puffer 5xC:

Puffer C fünffach konzentriert, aber Nonidet P 40 bleibt bei 0,6%

Puffer D:

116g Percoll + 30g Puffer 5xC mit 1N HCl einstellen auf pH 6; Vorsicht, nicht zuviel HCl zugeben, das Percoll flockt beim Zurücktitrieren mit KOH sehr leicht aus.

Puffer E:

45g Percoll + 6g Puffer 5xC mit 1N HCl einstellen auf pH 6; Vorsicht, nicht zuviel HCl zugeben.

Bei der Pufferherstellung wurden folgende Komponenten als Stammlösungen eingesetzt, wenn nicht anders vermerkt, gelöst in sterilem Aqua bidest:

NaCl	2M Lösung
MES	500mM Lösung, mit KOH eingestellt auf pH 6
EDTA	100mM Lösung
BSA	10%ige Lösung
Spermin	1M Lösung
Spermidin	2M Lösung
PMSF	100mM Lösung in absolutem Ethanol

Da mit der unveränderten Methode aus Kartoffelzellen jedoch keine Zellkerne isoliert werden konnten, die ihre gesamte RNA noch vollständig enthielten, mußte das Verfahren entsprechend modifiziert werden (vergleiche Ergebnisse Kap. 3.2.2.). Die modifizierte, verkürzte Methode ist im folgenden dargestellt.

5.3.2. Modifizierte Zellkernisolation

100g Zellen, 3-6d nach dem Verdünnen (1,5-21 Zellsuspension) wurden

- filtriert durch Miracloth
- gewaschen mit 800ml Puffer A
- 15 min inkubiert in 600ml Puffer A bei Raumtemperatur
- filtriert durch Miracloth
- 30 min inkubiert in 600ml Puffer B bei RT
- filtriert durch Miracloth
- gewaschen mit 400ml Puffer C mod.(modifiziert) (0-4°C, alle weiteren Schritte erfolgten mit gekühltem Puffer, auf Eis)
- homogenisiert in 400ml Puffer C mod. (aber mit 0,6% Nonidet p 40) + 2 Tropfen n-Octanol auf Eis für 4x15 s mit Ultra Turrax (von Janke & Kunkel, IKA-Werk) bei maximaler Geschwindigkeit (im Kältelabor, mit vorgekühlten Geräten)
- filtriert durch 130µm, 80µm und 20µm Siebtuch im Kühlraum auf Eis
- zentrifugiert für 5 min bei 2000g ohne Bremse in Sorvallzentrifuge (GSA Rotor, 3450rpm)

- Niederschläge gelöst in Puffer C mod. ad 24g
- 28g Puffer D mod. zugegeben
- zentrifugiert für 5 min bei 1000g ohne Bremse in Minifuge II (von Heraeus Christ, Windkesselrotor, 2500rpm)
- Niederschlag gelöst in 20ml Puffer E mod.
- zentrifugiert für 5 min bei 5000g ohne Bremse in Minifuge II (5500rpm)
- schwimmende Kernlage abgesaugt und suspendiert in 20ml Puffer C mod.
- zentrifugiert für 5 min bei 1000g ohne Bremse in Minifuge II
- aufgenommen in definiertem Volumen Puffer C mod. und Ausbeute bestimmt (vergl. Kap. 5.3.3.)
- zentrifugiert für 5 min bei 1000g ohne Bremse in Minifuge II
- Niederschlag aufgenommen in Puffer C mod. mit 50% Glycerin, so daß sich eine Kerndichte von 1×10^7 Kerne/ml ergab, und bei -80° gelagert oder ohne Glycerinzusatz für die Nukleinsäureanalyse extrahiert.

Eine Modifikation der Pufferzusammensetzung betraf nur Puffer C, folgende Komponenten waren in Puffer C mod. verändert:

Nonidet P 40: 0,24%

Spermin: 0,38mM

Spermidin: 2,5mM

Daraus folgte natürlich auch eine Veränderung der Zusammensetzung von Puffer D und E, da beide Anteile von Puffer 5xC mod. enthielten.

5.3.3. Bestimmung der Kernaussbeute

Um die Zahl der isolierten Kerne abzuschätzen, wurde das gewaschene Kernsediment in einem definierten Volumen Puffer C aufgenommen (je nach Größe des Niederschlagvolumens in 10-20ml) und in einem Eppendorfgeläß mit ethidiumbromidhaltigem Puffer C 1:10 verdünnt (80µl Puffer C + 10µl

Ethidiumbromidlösung (1mg/100ml) + 10µl Kernsuspension sorgfältig mischen). Die verdünnte Kernsuspension wurde in eine Hämatocytometerkammer (Neubauer hell-linig, Tiefe 0,100mm; 0.0025mm^2) eingefüllt, deren Kammerfaktor zuvor bestimmt worden war: die Zahl der Kerne, die in den 16 Quadranten eines Quadranten enthalten waren, multipliziert mit $1,1 \times 10^4$, ergab die Kernzahl pro Milliliter der verdünnten Suspension. Die Gesamtausbeute errechnete sich also folgendermaßen:

Kernzahl	x	$1,1 \times 10^4$	x	10	x	ml-Menge
(im		(Kammer-		(Verdünnungs-		(unverdünnte
Quadranten)		faktor)		faktor)		Suspension)

Das zählen der Kerne erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei 250facher Vergrößerung (siehe Kap. 5.4.1.). Durch die Ethidiumbromidfärbung konnten intakte und degenerierte Kerne gut unterschieden werden, nur intakte Kerne zeigten ein intensives, rotes Leuchten.

5.4. Mikroskopie

Die mikroskopische Beurteilung und Photodokumentation der Kernpräparate wurde mit einem Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskop von Leitz (Leitz Orthoplan) durchgeführt.

5.4.1. Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Kerne erfolgte bei Grünanregung (515-560nm) mit folgenden Filtern:

Ploemopak 2.1 Fluoreszenz-Auflichtilluminator mit Filterblock N2.1:

Anregungsbereich: grün

Anregungsfilter: Bandpassfilter 515-560nm

Teilerspiegel: Reflexions-Kurzpassfilter 580nm

Sperrfilter: Langpassfilter 580nm

Sowohl Phasenkontrast- als auch Hellfeldobjektive waren

geeignet, so daß in Kombination mit den 10fach vergrößern-
den Okularen (Periplan GW 10x M) folgende Vergrößerungen
möglich waren: 100fach (Objektiv: 170/-; 10/0,25; Phaco
1), 250fach (Objektiv: 160/0,17; 25/0,75 Oel, Fluores-
zenz), 500fach (Objektiv: 160/-; NPL Fluotar; 50/1,00 Oel;
Phaco 3) und 1000fach (Objektiv: 160/0,17; NPL Fluotar;
100/1,32 Oel, Phaco 3).

5.4.2. Phasenkontrastmikroskopie

Eine phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der Kernprä-
parate war bei 100facher, 500facher und 1000facher Ver-
größerung möglich (für Objektive vergleiche Kap. 5.4.1.).

5.4.3. Ethidiumbromidfärbung der Kerne

Für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurden die
Kerne mit Ethidiumbromid angefärbt, das sich in die
doppelhelikalen Bereiche der Nukleinsäuren einlagert und
bei Grünanregung (vergleiche Kap. 5.4.1.) fluoresziert.
Sollten die Kerne gezählt werden, wurden sie mit ethidium-
bromidhaltigem Puffer C 1:10 verdünnt, damit die Kern-
dichte im Präparat nicht zu hoch war (vergleiche Kap.
5.3.3.). Für eine Beurteilung der Kernpräparate ohne Men-
genbestimmung war es ausreichend, auf einem Objektträger
einen Tropfen Kernsuspension mit einem Tropfen Ethidium-
bromidlösung (1mg/100ml) zu mischen und mit einem Deck-
gläschen abzudecken.

5.4.4. Mikrophotographie

Die photographische Dokumentation der Kernpräparationen
erfolgte mit einem Photoaufsatz auf dem Mikroskop, der mit
einer Belichtungsautomatik verbunden war (Leitz Vario-
Orthomat). Negative wurden auf Technical Pan Filmen 2415
(ESTAR-AH Base) (18 DIN) der Firma Kodak gemacht, Positiv-
abzüge auf Ilfospeed Photopapier unterschiedlicher Härte
von der Firma Ilford.

5.5. In vitro Transkription in isolierten Zellkernen

Die isolierten Zellkerne wurden zum Testen ihrer Transkriptions-Aktivität mit ^3H -UTP inkubiert, zur Analyse ihrer Transkriptions-Produkte mit ^{32}P -UTP in Anlehnung an ein von WILLMITZER und WAGNER (1981) beschriebenes Verfahren.

5.5.1. ^3H -UMP Inkorporation zur Untersuchung des Zeitverlaufs der Syntheseaktivität

Die Polymeraseaktivität der Kerne wurde getestet indem 2×10^6 Kerne in

250 μl Testpuffer (siehe unten) mit

je 0,3mM ATP, UTP, GTP und CTP und

25 μCi 5,6 ^3H -UTP (spezifische Aktivität 43,5Ci/mmol, von Amersham)

bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurden.

Als Kontrolle, ob es sich tatsächlich um die Aktivität kerneigener Polymerasen handelte, wurden Parallelansätze mit 1 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin inkubiert, deren Einbaurate dadurch drastisch reduziert sein mußte.

Nach 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90 und 120 min wurden dem Reaktionsansatz Aliquots von 25 μl entnommen und zur Reinigung von nicht inkorporierten Nukleosidtriphosphaten auf speziell vorbereitetes Chromatographie-Papier aufgetragen (siehe Kap. 5.5.1.1.).

Der Testpuffer setzte sich nach Optimierung der Konzentration der Komponenten EDTA, MgCl_2 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (vergleiche Kap. 5.5.1.2.) folgendermaßen zusammen:

60mM Tris/HCl pH 8,0

250mM Saccharose

0,5% BSA (RNase-frei)

15% Glycerin

1mM EDTA

5mM MgCl_2

40mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5.5.1.1. Reinigung der Syntheseprodukte durch Papierchromatographie nach RACKWITZ et al. (1981)

Die während der Zeitverlaufsstudie abgenommenen Aliquots (vergleiche Kap. 5.5.1.) wurden auf Filterpapierstreifen aus Whatman 3MM von 13,5cm Länge und 1,5cm Breite aufgetragen, die bei 3,5cm abgeknickt waren und 2cm von diesem Knick entfernt (auf der längeren Seite) mit Essigsäure getränkt waren. Anschließend wurden die Streifen mit dem kurzen Teil in eine Wanne mit einer Lösung bestehend aus :

- 50 Teilen gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung,
- 50 Teilen 1M Natriumacetat-Puffer pH 5,2 und
- 5 Teilen Isopropanol

eingehängt und die Chromatographie beendet, sobald das Laufmittel bis zum freien Ende des Streifens gewandert war. Die Streifen wurden bei 100°C im Trockenschrank (von Heraeus Christ) getrocknet, die Auftragstellen ausgeschnitten und in 10ml Scintillator-Cocktail (Toluol + PPO + POPOP von Roth) im Tritium-Kanal (Packard Tri-carb 460 C) gemessen.

5.5.1.2. Optimierung des Transkriptionspuffers

Ausgehend von einem für isolierte Tabakzellkerne entwickelten Testpuffer (WILLMITZER und WAGNER, 1981) mit folgender Zusammensetzung:

60mM Tris/HCl pH 8,0

250mM Saccharose

0,5% BSA (RNase-frei)

15% Glycerin

0,1mM EDTA

5mM MgCl₂

40mM (NH₄)₂SO₄

wurden die Konzentrationen von

EDTA, MgCl₂ und (NH₄)₂SO₄ durchvariiert. Folgende Werte wurden getestet:

EDTA: 0,1; 1; 5; 10 und 15mM,

MgCl₂: 1; 3; 5; 7 und 10mM und

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 10; 20; 40 und 80mM

wobei für alle außer der variierten Komponente die ursprüngliche Konzentration beibehalten wurde.

Die Inkubationen wurden wie in Kap. 5.5.1. beschrieben durchgeführt.

5.5.2. ^{32}P -UMP Inkorporation zur Nukleinsäureanalyse der Syntheseprodukte

In vitro Ansätze isolierter Zellkerne für die Analyse der Transkriptionsprodukte wurden im wesentlichen wie unter 5.5.1. beschrieben, jedoch mit folgenden Abweichungen, durchgeführt:

Inkubationstemperatur war 29°C ,

Reaktionsdauer war 30 min für den gesamten Ansatz.

Die Ansätze enthielten als radioaktives Triphosphat $250\mu\text{Ci}$ alpha- ^{32}P -UTP (von Amersham, spezifische Aktivität: $410\text{Ci}/\text{mmol}$) und anstelle von 0,3mM nur 0,02mM nicht radioaktives UTP. Um die Aktivität von RNasen zu hemmen, wurden den Ansätzen 100 Units RNasin bzw. 40mM VRC zugefügt (vergl. Ergebnisse Kap. 3.5.2.).

5.5.2.1. Reinigung der Syntheseprodukte durch Säulenchromatographie

Nach 30 min Inkubationszeit wurde der gesamte Transkriptionsansatz zweimal phenolisiert (siehe Kap. 5.6.) und die wässrige Phase wie unter 5.12.1. beschrieben über Bio-Gel A 0,5 (von Bio Rad) von nicht umgesetzten Nukleosidtriphosphaten getrennt, gemessen, gesammelt und lyophilisiert.

5.5.2.2. Hemmstoffversuche

Um festzustellen welche der nukleären RNA Polymerasen für die in vitro Neusynthese in isolierten Zellkernen verantwortlich ist, wurden den Ansätzen folgende Transkriptionsinhibitoren zugesetzt:

alpha-Amanitin: 10^{-8}M , 10^{-6}M und 10^{-4}M und

Actinomycin D: $10\mu\text{g/ml}$

5.5.2.3. Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener RNase-Inhibitoren

Um die Aktivität von RNasen während der in vitro Transkription isolierter Kerne zu unterbinden, wurde die Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren getestet. Dazu wurden Zellkern RNA-Extrakte mit verschiedenen Mengen RNase A und unterschiedlichen Konzentrationen der getesteten RNase-Inhibitoren 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, phenolisiert, nach Zugabe von carrier RNA gefällt, unter vollständig denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch getrennt und silbergefärbt.

$10\mu\text{g}$ RNA wurden in einem Volumen von $50\mu\text{l}$ TPW I (mod.) (siehe Kap. 5.5.1.) mit $5,2\mu\text{g}$, 520ng , 52ng , $5,2\text{ng}$, 520pg RNase A und in einem Kontrollansatz ohne Zugabe von RNase A jeweils mit folgenden Inhibitoren inkubiert:

Jodacetat: 30mM ,

HSA: 10mM ,

ATA: $0,4\text{mM}$, $0,8\text{mM}$ und $1,6\text{mM}$

VRC: 10mM , 20mM und 40mM

PP: 25mM , 50mM und 100mM

RNasin: 100 Units als Referenzansatz

5.6. Nukleinsäureextraktion

(nach SÄNGER und RAMM, 1975)

Zu 1 Volumen Zellkernen, suspendiert in dem jeweiligen Puffer (Puffer C oder Testpuffer für Transkriptionsansätze) wurde 1 Volumen Schüttelphenol zugegeben und eine Minute kräftig geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4000rpm in der Minifuge II (von Heraeus Christ) oder in einer Eppendorffzentrifuge (bei Volumina kleiner als 1ml) wurde die wässrige (obere) Phase abgenommen (ohne Interphase) und damit die Phenolisierung wiederholt. Wieder wurde die wässrige Phase abgenommen und, wenn eine niedrige Nukleinsäurekonzentration erwartet wurde, mit 1µg/ml t-RNA (aus E.coli, Boehringer) als Carrier versetzt. Dazu wurden 2,5 Volumen 90% Ethanol mit 0,2M Natriumacetat zugegeben und über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend wurde für 45 min bei mindestens 5000g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 70% Ethanol (mit 0,2M Natriumacetat) gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Der Niederschlag wurde im Lyophilisator (Leybold-Heraeus GT-2) getrocknet und in sterilem Aqua bidest oder dem gewünschten Puffer aufgenommen (das Nukleinsäureäquivalent von 1×10^8 Kernen in 200µl).

Für die Nukleinsäureextraktion verwendete Lösungen:

"TES"-Puffer:

0,1M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)

0,01M EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)

0,1M NaCl

eingestellt auf pH 7.5 mit 1N HCl und autoklaviert.

Schüttelphenol:

1kg Phenol wurde in 1l Chloroform und 40ml Isoamylalkohol über Nacht gelöst und mit 300ml TES-Puffer equilibriert.

90% Ethanol mit 0,2M Natriumacetat (Fällungsalkohol):

27,2g Natriumacetat wurden in 90ml Aqua bidest gelöst, mit

etwa 10ml Eisessig auf pH 5 eingestellt, mit Aqua bidest auf 100ml aufgefüllt und mit 900ml absolutem Ethanol vermischt.

70% Ethanol mit 0,2M Natriumacetat (Waschalkohol):

27,2g Natriumacetat wurden in 290ml Aqua bidest gelöst, mit etwa 10ml Eisessig auf pH 5 eingestellt, mit Aqua bidest auf 300ml aufgefüllt und mit 700ml absolutem Ethanol vermischt.

5.6.1. DNase- und RNase-Behandlung der Nukleinsäureextrakte aus isolierten Zellkernen

Um die Nukleinsäurenatur der nachgewiesenen Sequenzen (vergl. Kap. 5.11.4.) festzustellen, wurde das Nukleinsäureäquivalent von 1×10^7 PSTV-infizierten Zellkernen, sowie je 40ng Carna 5, 5S RNA und PSTV in 8 μ l sterilem Aqua bidest gelöst und mit folgenden Nukleasen behandelt (BRANCH et al., 1981):

DNase I (von Miles), RNase A (von Boehringer), RNase III (von BRL), RNase H (von BRL), RNase T₁ (von Sankyo) und RNase T₂ (von BRL). Ihre spezifische Wirkungsweise ist im Ergebnisteil Kap. 3.4.3. beschrieben.

Jede der 4 RNA-Arten wurde mit jeder der Nukleasen inkubiert, wobei unterschiedliche Reaktionspuffer eingesetzt wurden, um den Reaktionsoptima der Enzyme gerecht zu werden. 10 μ l Reaktionspuffer wurden in vierfacher Konzentration zu den RNA-Lösungen pipettiert und soviel steriles Aqua bidest zugegeben, daß die Ansätze nach der Enzym-Zugabe ein Volumen von 40 μ l hatten.

Es ergaben sich also folgende Ansätze, die unterschiedlich lange bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurden:

RNA mit

50 μ g/ml DNase I in NEB, 15 min

20U/ml RNase III in NEB, 60 min

0,5 μ g/ml RNase A in NEB, 60 min

40U/ml RNase H in NEB, 60 min

25U/ml RNase T₁ in NSB, 60 min

25µ/ml RNase A in HSB, 60 min

31,5U/ml RNase T₂ in NH₄Ac.-P., 120 min

Die Inkubation wurde durch Abkühlen auf 0°C und sofortiges Phenolisieren der Ansätze gestoppt. Die wässrigen Phasen wurden EtOH-gefällt (vergl. Kap. 5.6.) und für die Gelelektrophorese eingesetzt.

Die vierfach konzentrierten Reaktionspuffer setzten sich wie folgt zusammen:

4xNEB: 0,12M Tris-HCl pH 8; 0,4M NaCl; 0,02M MgCl₂; 0,4mM EDTA; 0,4mM Dithiothreitol.

4xNSB: 0,04M Tris-HCl pH 7,6; 4mM EDTA.

4xHSB: 0,2M Tris-HCl pH 7; 0,4M NaCl; 4mM EDTA.

4xNH₄Ac.-P.: 0,2M Ammoniumacetat pH 4,5, eingestellt mit 4M Essigsäure

5.7. Vorbereitung der RNA-Proben für die Gelelektrophorese

Die phenolextrahierte und gefällte RNA wurde je nach den beabsichtigten Trennungsbedingungen unterschiedlich aufbereitet.

5.7.1. Vollständig denaturierte RNA-Proben

Die vollständige Denaturierung der RNA erfolgte durch Glyoxalierung der Proben (McMASTER und CARMICHAEL, 1977) nach folgendem Schema:

22µl einer Mischung, bestehend aus

150µl DMSO (Dimethylsulfoxid),

6µl 500mM Phosphatpuffer pH 6,5 (siehe Kap. 5.8.1.),

6µl SDS (Sodiumdodecylsulfat),

58µl Glyoxal (von BRL, wurde vor der Verwendung zweimal zur Reinigung bei -1°C kristallisiert und der flüssig gebliebene Anteil verworfen),

wurden mit 8µl RNA-Lösung

15min in einem Wasserbad (mit Thermomix 1441 von Braun) bei 50°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Nach Zugabe von 10µl "Probenpuffer" (siehe unten) waren

die Proben fertig für die Gelelektrophorese.

Der "Probenpuffer" enthielt:

10% Ficoll

1mM EDTA

10mM Na-Phosphat pH 6,5

0,1% SDS

0,05% Bromphenolblau

0,05% Xylencyanol FF

5.7.2. Partiell denaturierte RNA-Proben

RNA-Proben, die unter partiell denaturierenden Bedingungen getrennt werden sollten, wurden nach dem Trocknen des Alkoholsediments in TEB-Puffer (siehe Kap. 5.8.1.) aufgenommen, dem 8M Harnstoff und je 0,1% Bromphenolblau und Xylencyanol FF zugefügt worden waren.

5.7.3. Native Proben

RNA-Proben, die unter nativen Bedingungen getrennt werden sollten, wurden, in Abhängigkeit vom Puffer, in dem die Trennung vorgenommen werden sollte:

- in TEB (siehe Kap. 5.8.1.) mit 10% Saccharose und je 0,1% Bromphenolblau und Xylencyanol FF oder
- "Probenpuffer" (siehe Kap. 5.7.1.) aufgenommen.

5.8. Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Nukleinsäuren wurden verschiedenprozentige Polyacrylamidgele (3%, 3,5%, 5% und 10%) unter nativen, partiell denaturierenden und vollständig denaturierenden Bedingungen verwendet (SÄNGER et al., 1976; McMASTER und CARMICHAEL, 1977). Es handelte sich um Vertikalgele, sie waren sämtlich 1,5mm dick und hatten 10 (Gelfläche: 17x23 cm) bzw. 15 (Gelfläche: 20x25 cm) Probentaschen. Die großen Gele wurden verwendet, wenn viele Proben verglichen und daher möglichst auf demselben Gel getrennt werden sollten.

Es wurden außerdem verschiedene Agarosegele (LOCKER,

1979) und Agarose-Polyacrylamid-Mischgele getestet, deren Trennungseigenschaften jedoch keinen Anlaß zur weiteren Verwendung boten.

5.8.1. Herstellung der Polyacrylamidgele

Alle Gele wurden, wenn nicht anders vermerkt, aus folgenden Lösungen hergestellt:

- (1) Trenngel: 30g Acrylamid
0,75g Bisacrylamid
ad 100ml mit sterilem Aqua bidest
- (2) Sammelgel: 10g Acrylamid
2,5g Bisacrylamid
ad 100ml mit sterilem Aqua bidest
- (3a) TEB-Puffer 10fach konzentriert:
108g Tris
9,3g EDTA
55g Borsäure
ad 1000ml mit Aqua bidest und
autoklavieren
- (3b) Phosphatpuffer pH 6,5 , 500mM
500mM Na_2HPO_4 Lösung mischen mit
500mM NaH_2PO_4 Lösung bis pH 6,5 erreicht
ist.
- (4) Ammoniumperoxodisulfatlösung:
1g Ammoniumperoxodisulfat ad 10ml mit
sterilem Aqua bidest
(katalysiert die Polymerisation)
- (5) TEMED unverdünnte Lösung
 N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin,
(dient als Radikalstarter)

Für ein Gel mit 10 Probestaschen (17x23x0,15cm) wurden 60ml Trenngel und 12ml Sammelgel angesetzt.

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch zwei seitlich eingesetzt Teflon-Spacer in einer

Distanz von 1,5mm gehalten und mit Hilfe einer speziell angefertigten Halterung senkrecht aufgestellt wurden. Das Auslaufen der Gelflüssigkeit wurde durch Einpressen der Glasplatten in eine Gummimatte verhindert. Die Trenngellösung wurde unmittelbar nach der Zugabe des Katalysators zwischen die Glasplatten gegossen, wobei der Einschluß von Luftbläschen sorgfältig vermieden wurde und mit sterilem Aqua bidest überschichtet, um eine glatte Grenzfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen, mit wenig Sammelgellösung zweimal gespült, die Sammelgellösung aufgetragen und unter Vermeidung von Lufteinschlüssen ein 1,5mm starker Teflon-Kamm eingetaucht, durch den die Probestaschen ausgespart wurden. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Teflon-Kamm vorsichtig entfernt und die Gele in ein Elektrophoresegestell mit übereinander angeordneten Pufferreservoirs eingespannt. Die Reservoirs wurden mit Laufpuffer gefüllt, so daß beide Gelenden mit dem Puffer bedeckt und die Probestaschen gefüllt waren. Jedes Reservoir bestand aus zwei Kammern, die mit Filterpapierbrücken (MN-Chromatographiepapier von Macherey, Nagel) miteinander verbunden wurden. Dadurch wurde vermieden, daß der Gellauf von der Zersetzung des Puffers an den Elektroden beeinträchtigt wurde.

5.8.1.1. Partiiell denaturierende Gele

Ein partiell denaturierendes 5% Polyacrylamid setzte sich folgendermaßen zusammen:

Trenngel:	Harnstoff	28,8g
	Lösung (1)	10ml
	Lösung (3a)	12,5ml
	TEMED (4)	44µl
	mit sterilem Aqua bidest auffüllen ad 59,8ml	
	Lösung (5)	256µl
Sammelgel:	Harnstoff	5,8g
	Lösung (2)	3ml

Lösung (3a)	2,5ml
TEMED (4)	8,8µl
mit sterilem Aqua bidest auffüllen ad 12ml	
Lösung (5)	53µl

Für andersprozentige Gele wurde der Anteil der Lösung (1) bzw. (2) entsprechend variiert.

Die Auftrennung der Proben erfolgte über Nacht bei 7°C mit TEB als Laufpuffer, bei einer Stromstärke von 8mA/Gel (Spannungsquelle: Electrophoresis-constant power supply ECPS 3000/150). Der Gellauf wurde beendet, wenn das den Proben beigefügte Xylencyanol den unteren Rand der Glasplatten erreicht hatte.

5.8.1.2. Native und voll denaturierende Gele

Die Trennung nativer und vollständig denaturierter Proben konnte auf demselben Gel erfolgen. Ein 3,5% Polyacrylamidgel setzte sich wie folgt zusammen:

Trenngel:	Lösung (1)	7ml
	Lösung (3b)	1,2ml
	TEMED (4)	44µl
mit sterilem Aqua bidest auffüllen ad 59,8ml		
	Lösung (5)	53µl
Sammelgel:	Lösung (2)	2,1ml
	Lösung (3b)	240µl
	TEMED (4)	8,8µl
mit sterilem Aqua bidest auffüllen ad 12ml		
	Lösung (5)	53µl

Bei andersprozentigen Gelen wurde der Anteil der Lösung (1) bzw. (2) entsprechend variiert.

Die Auftrennung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 40mA/Gel. Der Gellauf wurde beendet, wenn das den Proben beigefügte Bromphenolblau den unteren Plattenrand erreicht hatte.

5.8.2. Herstellung von Agarosegelen

Agarosegele wurden sowohl als Vertikal- als auch als Horizontalgele hergestellt. Es wurden Agarosen verschiedener Hersteller (Serva, BRL, Seakem) in 1,5%igen Gelen mit nativen und partiell denaturierenden Bedingungen (LOCKER, 1979) getestet. Die Zusammensetzung der Gele war konstant, nur die Menge (100ml bei Vertikalgelen, 200ml bei Horizontalgelen) und die Art der Agarosen wurden variiert. Partiiell denaturierende Gele unterschieden sich von den nativen nur durch den Zusatz von 6M Harnstoff, so daß sich folgendes Grundrezept ergab:

1,5g Agarose (BRL Nr. 5510, BRL low melting Nr. 5517, Serva Nr. 11401 oder Seakem HGT P),

0,28g Jodessigsäure (als RNase-Inhibitor),

2,5ml TEBx10-Puffer (TEB-Puffer 10fach konzentriert, siehe Kap. 5.8.1.),

36g Harnstoff (nur bei partiell denaturierenden Gelen!),
ad 100ml mit sterilem Aqua bidest

Diese Mischung wurde kurz gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war.

Als Elektrophoresepuffer wurde 1/4 TEB-Puffer verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 5V/cm Elektrodenabstand.

5.8.2.1. Vertikale Agarosegele

Die vertikalen Gele wurden nach dem gleichen Prinzip hergestellt wie die Polyacrylamidgele (siehe Kap. 5.7.), jedoch mit Glasplatten, deren Oberfläche durch Sandstrahl-Behandlung aufgeraut war, um zu verhindern, daß die Agarose nach Entfernung des abschließenden Gummis nach unten rutschte. Es war außerdem günstiger 2mm dicke Gele anzufertigen, da die Agarose zwischen Platten mit 1,5mm Abstand so langsam floß, daß sie schon erstarrte, bevor der untere Bereich vollständig gefüllt war. Die Platten wurden auf 80°C vorgeheizt, um zu verhindern, daß die Agarose vorzeitig fest wurde, die flüssige Agarose eingefüllt und

ein Teflon-Kamm zur Formung der Probentaschen eingetaucht.

5.8.2.2. Horizontale Agarosegele

Die Gele wurden in Plexiglasgestelle gegossen, die an den offenen Seiten mit Klebeband verschlossen waren, das nach dem Erstarren der Agarose entfernt wurde, so daß das Gel in diesem Gestell in die Elektrophorese-Apparatur (No.1020 Model H 1 von BRL) gehängt werden konnte. Für die Herstellung horizontaler Agarosegele war ein doppelter Ansatz des Grundrezeptes nötig, andernfalls reichte die Flüssigkeit nicht aus um die Fläche von 25 x 20 cm zu bedecken. Die Gele wurden dadurch etwa 5mm dick, die Probentaschen etwa 4mm tief, es konnten, bei der Verwendung 2mm dicker Kämme, infolgedessen maximal 30µl Probe aufgetragen werden.

Es wurde soviel Laufpuffer (1/4 TEB-Puffer, siehe Kap. 5.8.1.) für die Elektrophorese eingefüllt, daß das Gel mit einer etwa 5mm dicken Flüssigkeitsschicht bedeckt war.

5.8.3. Herstellung von Agarose-Polyacrylamid-Gelen

Mischgele aus Agarose und Polyacrylamid wurden als Vertikalgele angefertigt (vergleiche Kap. 5.8.1.). Die Agaroselösung (0,5%) und die Polyacrylamidlösung (3%) wurden getrennt hergestellt und gemischt, wenn das Gel gegossen werden konnte. Das Gießen des Gels mußte sehr rasch erfolgen, da durch die hohe Temperatur der Agarose (60-70°C) die Polymerisation des Acrylamids sehr beschleunigt würde und es leicht geschehen konnte, daß das Gel fest wurde, bevor es bis zum unteren Rand der Glasplatten geflossen war. Es wurden Gele mit partiell denaturierenden und nativen Bedingungen hergestellt, die sich nur durch die An- bzw. Abwesenheit von 8M Harnstoff unterschieden. Zusätzlich zur routinemäßig eingesetzten Acrylamid-lösung (1) (Acrylamid:Bisacrylamid=20:1, vergleiche Kap. 5.8.1.) wurde eine Lösung (1a) eingesetzt mit dem Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid=10:1 (30g Acrylamid* + 3g Bis-

acrylamid, mit sterilem Aqua bidest ad 100ml).

Für die Mischgelherstellung ergab sich also folgendes Grundrezept:

Lösung (A):

0.3g Agarose (Serva Nr. 11401) wurden in 26,7ml sterilem Aqua bidest unter Rühren kurz gekocht, bis die Agarose gelöst war und dann die Hitzezufuhr abgeschaltet. Für die Herstellung eines partiell denaturierenden Geles wurden in diese Lösung noch 29g Harnstoff eingerührt. Die Lösung wurde kurz entgast.

Lösung (B): (Stammlösungen siehe Kap. 5.8.1.)

6ml Lösung (1) bzw. (1a) (Acrylamidlösungen), 1,5ml Lösung (3a) (TEB-Puffer, 10fach konzentriert) und 267µl Lösung (4) (10% Ammoniumperoxodisulfatlösung) wurden zusammenpipettiert und entgast.

Das Entgasen der Lösungen sollte verhindern, daß anwesendes O₂ bereits vor der TEMED-Zugabe die Polymerisation startet.

Die Lösungen (A) und (B) wurden gemischt, mit sterilem Aqua bidest ad 60ml aufgefüllt, 44µl TEMED zugegeben, rasch zwischen die Glasplatten gegossen und der Teflon-Kamm eingedrückt.

Laufpuffer für die Gelelektrophorese war 1/4 TEB-Puffer, die Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur bzw. bei 37°C bei einer Stromstärke von 15mA/Gel.

5.9. Methoden zum Nachweis der Nukleinsäuren in Gelen

RNA-Proben, die nicht radioaktiv waren, wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung mit zwei verschiedenen Färbemethoden nachgewiesen:

- mit Ethidiumbromid in Agarosegelen und Polyacrylamidgelen,
- mit Silberfärbung (GOLDMAN und MERRIL, 1982) in Polyacrylamidgelen.

5.9.1. Ethidiumbromidfärbung

Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Gele 5min in einer Ethidiumbromidlösung (1mg/l H₂O) inkubiert und nach kurzem wässern über einem UV-Transilluminator (von Ultraviolet Products Inc., Chromato-Vue Transilluminator, Model C,63) mit einer Wellenlänge von 266nm betrachtet. Die Dokumentation erfolgte durch Schwarz-Weiß-Photographie unter Verwendung eines Orange-Filters (Kamera: Polaroid MP 4, Film: Polaroid mit Negativ).

5.9.2. Silberfärbung

Für die Silberfärbung nach der Kaliumdichromat-Methode (GOLDMAN und MERRIL, 1982) wurden die Gele nacheinander in folgenden Lösungen geschwenkt:

3min in: 50% Methanol,
12% Essigsäure

20min in: 10% Methanol,
5% Essigsäure

5min in: 3,4mM K₂Cr₂O₇,
3,2mM HNO₃

10min in: Aqua bidest

20min in: 12mM AgNO₃

10min in: Aqua bidest

die Banden wurden entwickelt in

0,28M Na₂CO₃,
0,05% Formaldehyd.

Dafür mußten 3 Bäder bereitgehalten werden und das Gel jeweils in das nächste überführt werden, sobald bräunliche Wolken in der Flüssigkeit erschienen.

Fixiert wurde

5min in: 1% Essigsäure

Die Gele wurden auf einem Transilluminator mit weißem Licht betrachtet, die Dokumentation erfolgte durch Schwarz-Weiß-Photographie mit Kodak Technical Pan Kleinbildfilmen. Die Gele wurden anschließend getrocknet (auf Bio Rad Slab Gel Dryer Model 1125 bzw. 224) und sind in

dieser Form ebenfalls zur Dokumentation geeignet.

5.9.3. Nachweis radioaktiver RNA-Banden durch Autoradiographie
32p- oder 125J-markierte RNA auf Gelen oder Blots wurden autoradiographisch nachgewiesen. Dazu wurden Röntgenfilme (Kodak X-Omat AR Filme oder Fuji X-ray Film RX) auf getrockneten Gelen oder Blots (gewaschen, trockengetupft und in dünne Plastikfolie (Haushaltsfolie) eingeschlagen) zusammen mit DuPont Intensifying Screens in lichtdichten Kassetten bei -80°C exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einem automatischen Röntgenfilmentwickler (Agfa Gevomatic).

5.9.4. Densitometrische Bestimmung der Intensität der Schwärzung eines Autoradiogramms

Um das Ausmaß der Hybridisierung verschiedener radioaktiver Proben aus einem Versuch an membranfixierte Komplementärsequenzen (vergleiche Kap. 5.11.5.) zu vergleichen wurden die schwarzen Spots eines Films in einem Gilford Spektralphotometer mit einem speziellen Adapter für Filme bei 632 nm gemessen. Die optische Dichte der einzelnen Spots wurde in Form von Peaks von einem Schreiber auf Papier aufgezeichnet. Als Maß für die Schwärzung wurden die Peaks ausgeschnitten und ihr Gewicht auf einer Analysenwaage bestimmt.

5.10. Methoden zur Übertragung der Nukleinsäuren auf Papierfilter

Für den selektiven Nachweis Viroid-spezifischer Sequenzen durch molekulare Hybridisierung war es zunächst nötig, die RNA auf eine feste Matrix zu transferieren und zu binden. Es wurden verschiedene Methoden für die Nukleinsäureübertragung getestet.

5.10.1. Transfer der Nukleinsäuren auf DBM-Papier durch Kapillarblotting nach ALWINE et al. (1977)

Das für den Nukleinsäuretransfer benutzte diazotierte Aminobenzylloxymethyl-Papier (DBM) war als solches nicht stabil und konnte in dieser Form nicht gelagert werden. Da es in nicht diazotierter Form (ABM) bei 4°C im Exsikkator über mehrere Wochen stabil ist, wurde es in dieser Form gelagert und jeweils kurz vor dem Transfer diazotiert.

5.10.1.1. Herstellung von Aminobenzylloxymethyl-Papier (ABM) und Diazotierung

- Zur Herstellung des lagerfähigen Aminobenzylloxymethyl-Papiers wurde ein Whatman 540 Filterpapier (20x20cm²) mit
- 10ml der folgenden Lösung vollgesaugt:
0,8g 1-((m-Nitrobenzyl oxy)methyl)pyridinchlorid (NBPC) +
0.25g Natriumacetat gelöst in 10ml Aqua bidest
 - und anschließend bei 60°C getrocknet.
 - Das getrocknete Papier wurde 35 min bei 135°C gebacken,
 - zweimal 20 min in Aqua bidest auf einem Taumler (von Heidolph) gewaschen
 - und nochmals bei 60°C getrocknet.
 - Das trockene Papier wurde zweimal 20 min in Benzol gebadet,
 - an der Luft getrocknet,
 - 30 min in 150ml einer 20%igen Natriumdithionitlösung von 60°C inkubiert und
 - 20 min in Aqua bidest gewaschen.
 - Anschließend wurde es in 30%iger Essigsäure geschwenkt
 - und solange mit Aqua bidest gespült, bis kein H₂S-Geruch mehr auftrat.
 - Nachdem es an der Luft getrocknet war, konnte das so gewonnene ABM-Papier bis zur Diazotierung im Exsikkator bei 4°C gelagert werden.

Diazotierung:

Für die Diazotierung wurde das ABM-Papier in einem Gemisch aus folgenden Lösungen bei 4°C 30 min inkubiert:

40ml H₂O, 80ml 1,8M HCl und 3,2ml frische NaNO₂-Lösung (10mg/ml).

Mit Stärke-Jodid-Papier wurde geprüft, ob noch freies H₂S auftrat (H₂S reduziert Jodid zu Jod, das dann mit Stärke die charakteristische Blaufärbung zeigt) und anschließend 5x5 min mit kaltem Aqua bidest gewaschen. Bei den darauffolgenden Inkubationen von

2x10 min in eiskaltem 25mM Kaliumphosphat-Puffer mit pH 6,5 (Herstellung analog dem Natriumphosphat-Puffer in Kap. 5.8.1.) färbte sich, wenn die Reaktion erfolgreich war, das Papier intensiv gelb. Es wurde bis zur Benutzung für den Transfer bei 0-4°C gehalten.

5.10.1.2.Vorbereitung des Gels für den Transfer

Nachdem der Gellauf beendet war, wurde das Gel (5% Polyacrylamid mit 8M Harnstoff in TEB-Puffer)

40 min in 200ml 50mM NaOH geschwenkt, um die RNA-Ketten zu zerkleinern,

2x10 min in je 200ml 200mM Kaliumphosphat-Puffer mit pH 6,5 und

2x5 min in je 200ml 25mM Kaliumphosphat-Puffer equilibriert.

5.10.1.3.Nukleinsäuretransfer durch Kapillarblotting

Das vorbereitete Gel wurde auf einen etwa 5cm hohen Sockel aus Filterpapier (von Macherey, Nagel; MN-Chromatographiepapier 866 oder Whatman 3MM) gelegt, der mit Transferpuffer (25mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5) vorgesaugt war. Das Gel wurde mit 4 Streifen Nescofilm eingerahmt, um zu vermeiden, daß das DBM-Papier, das auf das Gel gelegt wurde, direkten Kontakt zum Filterpapiersockel hatte, da dies die Effektivität des Transfers eingeschränkt hätte. Auf das DBM-Papier wurde noch ein feuchtes Filterpapier

gelegt und darüber eine etwa 10cm dicke Schicht trockenen, stark saugfähigen Papiers (Filterpapier oder Papierhandtücher). Beim Aufeinanderlegen der feuchten Schichten wurde sorgfältig vermieden, daß Luft dazwischen eingeschlossen wurde, da diese den Transfer stört. Der so entstandene "Turm" wurde mit einer Glasplatte bedeckt und mit Blei beschwert. Nach 15-20h wurde der Transfer abgebrochen und der Blot 4h bei 80°C im Vakuum gebacken.

5.10.2. Transfer der Nukleinsäure auf Nitrocellulose durch Kapillarblotting nach P.THOMAS (1980)

Der Transfer der Nukleinsäuren erfolgte durch Übersaugen, wie unter 5.10.1.3. bereits beschrieben wurde. Als Membranfilter diente Nitrocellulose (von Schleicher & Schüll), die in sterilem Aqua bidest angefeuchtet und in 20xSSC (3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat) equilibriert worden war. Transferpuffer war 20xSSC. Nach 15-20h wurde der Transfer abgebrochen und der Blot 4h bei 80°C im Vakuum gebacken.

5.10.3. Transfer der Nukleinsäuren auf Gene Screen Transfer (GST) Membrane (von New England Nuclear (NEN))

Der Nukleinsäuretransfer durch Kapillarblotting auf Gene Screen und die Fixierung an der Membran erfolgte wie für Nitrocellulose unter 5.10.2. beschrieben.

5.10.4. Transfer der Nukleinsäuren durch Elektroblootting

Der Nukleinsäuretransfer auf Gene Screen bzw. Nitrocellulose im elektrischen Feld wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers der GST Membran (NEN) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf den Methoden von WAHL et al. (1979), STELLWAG und DAHLBERG (1980), P.THOMAS (1980), und BITTNER et al. (1980).

Für den Transfer wurde das Gel mit den getrennten Nukleinsäuren und das mit sterilem Aqua bidest befeuchtete und in Transferpuffer equilibrierte Membranfilter in ein

"Sandwich" verpackt, das aus folgenden Schichten bestand: 1 "Scotch Brite", 3 Lagen Whatman 3MM mit Transferpuffer befeuchtet, Gel, Membran, 3 Lagen feuchtes Whatman 3MM und wieder 1 "Scotch Brite". Auch hier war sorgfältig darauf zu achten, daß zwischen den Schichten keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Dieser "Sandwich" wurde zwischen 2 Plastikgittern im Puffergefäß so eingespannt, daß die Transfermembran anodal vom Gel angeordnet war (Electrotransfersystem von Bio Rad).

Der Transfer erfolgte in 25mM Natriumphosphat-Puffer mit pH 6,5, (siehe Kap. 5.8.1.) der mit einer Kühlschlange mit 4°C (angeschlossen an einen Kryostaten der Firma Desaga) gekühlt wurde, bei folgenden Stromstärken:

0.25A für 2h, 1,0A für eine Stunde.

Nach Angaben der Vorschrift werden niedermolekulare RNAs bei niedriger Stromstärke und hochmolekulare RNAs bei hoher Stromstärke besser transferiert.

Die Fixierung der Nukleinsäuren an der Membran erfolgte durch 4h backen bei 80°C im Vakuum.

5.10.5. Aufbringen der Nukleinsäuren auf Gene Screen im Dot Blot-Verfahren

Beim Dot Blot erfolgt vor dem Aufbringen der Nukleinsäuren auf das Membranfilter keine gelelektrophoretische Trennung, die Nukleinsäuren sind in 3M Lithiumacetat gelöst. Liegen die Nukleinsäuren nicht bereits einzelsträngig vor, müssen sie, bevor sie im Lithiumacetat aufgenommen werden, durch Glyoxalierung (vergleiche Kap. 5.7.1.) zu Einzelsträngen denaturiert werden.

Die mit sterilem Aqua bidest angefeuchtete Transfermembran wurde in ein speziell gefertigtes Gestell (von BRL) eingespannt, das 12x8 Auftragstellen hatte (Bohrungen von etwa 5mm Durchmesser durch das etwa 1,5cm dicke Plexiglas, die mit einem Dichtungsring an die Membran anschlossen), bei denen die aufgetragenen Proben durch die eingespannte Membran hindurch nach unten abgesaugt werden konnten.

Aufgrund der Porengröße der Membran blieben die Nukleinsäuren im Filter hängen, es entstanden "Spots", an die später die komplementären, radioaktiven Proben angelagert und autoradiographisch visualisiert wurden.

Nachdem die feuchte Membran eingespannt war, wurde jede Auftragstelle, die benutzt werden sollte mit 300µl 20xSSC (vergl. Kap. 5.10.2.) vorbehandelt und gewartet, bis das gesamte Volumen abgesaugt war. Der Unterdruck wurde mit einer Wasserstrahlpumpe hergestellt. Daraufhin wurde die einzelsträngige Probe in 3M Lithiumacetat aufgetragen und ebenfalls vollständig absaugen gelassen. Zur Markierung der benutzten Auftragstellen wurde in jede 2µl 20xSSC mit etwas Bromphenolblau pipettiert, das ebenfalls auf der Membran blieb. Anschließend wurde mit 300µl 20xSSC nachgespült, damit keine Nukleinsäuren an den Rändern der Auftrag-"Brunnen" haften blieben. Auch hier wurden die Nukleinsäuren durch 4h backen bei 80°C im Vakuum fixiert.

Folgende Proben wurden aufgetragen:

- je 700ng/Spot einzelsträngige, M13-klonierte PSTV DNA von (+)-Polarität mit 1,2 und 4 einklonierten PSTV-Sequenzen,
- je 700ng/Spot einzelsträngige, M13-klonierte PSTV DNA von (-)-Polarität mit 1 und 2 einklonierten PSTV-Sequenzen und
- 10ng/Spot glyoxaliertes, reines PSTV.

Sämtliche klonierten PSTV DNA-Proben wurden freundlicherweise von Dipl.Chem. Martin Tabler, Abteilung Viroidforschung des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

Die Proben wurden mit einem Volumen 6M Lithiumacetat auf 3M Lithiumacetat eingestellt, das Gesamtvolumen wurde kleiner als 300µl gehalten.

5.11. Methoden zur Hybridisierung radioaktiver Proben an membranfixierte Nukleinsäuren zum Nachweis PSTV-spezifischer Sequenzen

Die molekulare Hybridisierung besteht aus mehreren Schritten. Bei der Prähybridisierung (1) wird der Blot in Hybridisierungspuffer mit hitzedenaturierter, einzelsträngiger (ss) DNA inkubiert. Dabei werden alle freien Bindestellen für Nukleinsäuren durch Anlagerung der DNA abgesättigt. Bei der Hybridisierung (2) ist dem Puffer eine radioaktiv markierte Probe zugefügt, die zu den gesuchten, an der Membran fixierten Sequenzen komplementär ist. Sie hat eine höhere Affinität zu den ihr komplementären Sequenzen als die unspezifisch angelagerte DNA und kann diese infolgedessen an diesen Stellen verdrängen. Beim anschließenden Waschgang (3) werden alle unspezifischen und daher weniger stabilen Anlagerungen wieder gelöst, spezifische Hybridisierungen bleiben bestehen.

Der Nachweis der so entstandenen radioaktiven Bereiche erfolgt durch Autoradiographie (siehe Kap. 5.9.3.).

5.11.1. Hybridisierung der DBM-"Blots" mit ^{125}J -PSTV zum Nachweis (+)- und (-)-spezifischer PSTV-Sequenzen (nach ALWINE et al. (1977))

Für die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde der Blot in eine Kunststoff-Folie eingeschweißt, so daß der Abstand der Schweißnaht an drei Seiten 0,5-1cm, an einer etwa 3cm war. Zum Einfüllen des Puffers wurde jeweils eine Ecke an der Seite abgeschnitten, die vom Blot den größten Abstand hatte. Der Puffer ($80\mu\text{l}/\text{cm}^2\text{Blot}$) wurde mit einer Einmalspritze mit einer dicken Kanüle (gelbe Luer) eingefüllt, durch einquetschen des Beutels zwischen zwei Glasplatten die Luft herausgepresst und die Ecke wieder zugeschweißt. Die Inkubation erfolgte zunächst in einem Brutschrank mit 42°C , Prähybridisierung und Hybridisierung jeweils über Nacht. In späteren Versuchen wurde im Wasserbad (mit Thermomix 1441 von Braun) inkubiert, da mit

diesem die Temperatur exakter kontrolliert werden kann. Der Austausch von Prähybridisierungs- und Hybridisierungspuffer erfolgte, wie für das Einfüllen beschrieben, über eine aufgeschnittene Ecke.

Der Hybridisierungspuffer setzte sich wie folgt zusammen:
50% Formamid (von BRL, zweimal bei -1°C kristallisiert, den flüssig gebliebenen Anteil jeweils verworfen)

5xSSC (0,75M NaCl, 75mM Natriumcitrat)

0,02% BSA (Bovine Serum Albumin von BRL, RNase-frei)

0,02% Ficoll (MW 40 000)

0,02% PVP (Polyvinylpyrrolidon, MW 400 000)

2mg/ml Heringssperm-DNA (gelöst in Aqua bidest, zweimal phenolisiert, gefällt, gelöst in Aqua bidest und zur Denaturierung autoklaviert)

Der Prähybridisierungspuffer enthielt zusätzlich 1% Glycin.

Zum Nachweis PSTV-spezifischer Sequenzen wurde dem Hybridisierungspuffer ^{125}J -PSTV (50 μg) zugegeben und hitzedenaturiert (vergl. Kap. 5.12.3.). Dieses war zu diesem Zeitpunkt noch sehr schwach radioaktiv markiert, da es noch mit dem nicht modifizierten Verfahren hergestellt worden war (vergleiche Kap. 5.12.1.).

Nach Abbruch der Hybridisierung wurde der Blot bei 42°C 6 mal 35 min lang in folgendem Waschpuffer gewaschen:

50% Formamid

5xSSC

Der gewaschene Blot wurde für die Autoradiographie (vergleiche Kap. 5.9.3.) trockengetupft und zwischen dünne Kunststoff-Folie (Haushaltsfolie) gelegt.

5.11.2. Hybridisierung der Nitrocellulose-Blots mit ^{125}J -PSTV zum Nachweis (+)- und (-)-spezifischer PSTV-Sequenzen (nach P.THOMAS, 1980)

Die Blots wurden, wie unter 5.11.1. beschrieben, eingeschweißt und im Wasserbad bei 42°C in folgenden Puffern (100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Blot) inkubiert:

Prähybridisierungspuffer:

50% Formamid (2x kristallisiert)

5xSSC

50mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5

0,02% BSA

0,02% Ficoll (MW 40 000)

0,02% PVP (MW 400 000)

250mg/ml Heringssperm-DNA (hitzedenaturiert)

Der Hybridisierungspuffer bestand aus 4 Teilen Prähybridisierungspuffer und einem Teil 50ziger Dextransulfat-Lösung. Als radioaktive Probe zum Nachweis PSTV-spezifischer Sequenzen wurde ^{125}J -PSTV (vergleiche Kap. 5.12.1.) zugegeben und hitzedenaturiert (vergl. Kap. 5.12.3.).

Für den Hybridisierungsschritt mit der radioaktiven Probe wurde der Beutel in eine zweite Folie eingeschweißt, um eine Kontamination des Wasserbades durch radioaktive Pufferreste an der Einfüllstelle zu vermeiden.

Nach Abbruch der Hybridisierung wurde der Blot wie folgt gewaschen:

4x5 min in 2xSSC (0,3M NaCl, 30mM Natriumcitrat) +
0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat)

2x15 min in 0,1xSSC (15mM NaCl, 1,5mM Natriumcitrat) +
0,1% SDS bei 50°C

Der gewaschene Blot wurde trockengetupft und für die Autoradiographie (vergleiche Kap. 5.9.3.) zwischen Haushaltsfolie gelegt.

5.11.3. Hybridisierung der Gene Screen Blots mit ^{125}J -PSTV zum Nachweis (+)- und (-)-spezifischer PSTV-Sequenzen

Das Einschweißen der Blots erfolgte wie unter 5.11.1. beschrieben, die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers entsprach den Empfehlungen des Herstellers der GST Membran (NEN):

50% Formamid (zweimal kristallisiert)

5xSSC

0,02% Ficoll (MW 40 000)

0,02% PVP (MW 400 000)

0,02% BSA (RNase-frei)

1% SDS

Dem Prähybridisierungspuffer wurden 130µg/ml ssDNA (aus Heringssperma, vergleiche Kap. 5.11.1) zugegeben, dem Hybridisierungspuffer 65µg/ml ssDNA und 25ng/ml hitzedenaturiertes ^{125}J -PSTV (vergl. Kap. 5.12.3.) mit einer spezifischen Aktivität von etwa $33 \times 10^6 \text{ cpm/ng}$ (vergleiche Kap. 5.12.1.). Beide Puffer wurden in einer Menge von 30µl/cm² Blot eingesetzt.

Die Hybridisierungen wurden bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt:

42°C zum Vergleich mit den Hybridisierungen auf DBM-Papier und Nitrocellulose,

55°C zum Nachweis (+)- und (-)-spezifischer Sequenzen und

70°C zum Nachweis (-)-spezifischer Sequenzen.

Das Waschen der hybridisierten Blots geschah ebenfalls nach Empfehlung des Membranherstellers:

2x5 min in 200ml 2xSSC

2x30 min in 200ml 2xSSC + 1% SDS bei 8°C mehr als der jeweiligen Hybridisierungstemperatur, mit vorgeheizten Puffern im Schüttelwasserbad (von Köttermann) und

2x30 min in 200ml 0,1xSSC.

Die Blots wurden für die Autoradiographie (vergleiche Kap. 5.9.3.) trockengetupft und zwischen Haushaltsfolie gelegt.

5.11.4. Hybridisierung der "Gene Screen Blots" mit ^{32}P -markierten Oligodeoxyribonukleotiden zum getrennten Nachweis (+)- und (-)-spezifischer PSTV-Sequenzen

Der (+)- bzw. (-)-PSTV Nachweis mit den ^{32}P -markierten Oligodeoxyribonukleotiden (Primer) p14 I, p 15 (beide für den (+)-Nachweis) und p 14 II (für den (-)-Nachweis) erfolgte wie unter 5.11.3. für ^{125}J -PSTV beschrieben, erforderte jedoch eine drastische Senkung der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen. Im Hybridisierungspuffer wurde

daher das schmelzpunkterniedrigende Formamid durch steriles Aqua bidest ersetzt, die Hybridisierungstemperatur lag nach der Optimierung (getestete Temperaturen: 25°, 35°, 45°, 55° und 65°C, daraufhin: 32°, 35°, 38°, 41° und 44°C) bei 41°C.

Die Primer lagen als Einzelstrang-DNA vor, mußten also nicht hitzedenaturiert werden und wurden dem Hybridisierungspuffer so zugesetzt, daß sich eine spezifische Aktivität von 1×10^6 cpm/ml ergab. Der Waschgang bei hoher Temperatur erfolgte bei Hybridisierungstemperatur und nicht, wie bei ^{125}J -PSTV, 8°C darüber.

Die Primer wurden freundlicherweise von Frau Dipl.Chem. Martina Schnölzer, Abteilung Viroidforschung des Max-Planck-Inst. für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt, die Markierung erfolgte wie unter 5.12.2. beschrieben.

5.11.5. Hybridisierung von ^{32}P -markierten Kern-Transkripten gegen Gene Sreen-fixierte PSTV-Sequenzen zum Nachweis der *in vitro* PSTV-Neusynthese

Die angewandte Hybridisierungsmethode wurde unter 5.11.3. beschrieben. Für den Nachweis der in isolierten Kernen *in vitro* neu synthetisierten (+)- bzw. (-)PSTV-Sequenzen mußten die unter 5.11.3. beschriebenen Hybridisierungsbedingungen noch stringenter gestaltet werden, um ihre Spezifität zu sichern. Dies geschah durch Erhöhen der Temperatur. Unter den getesteten Temperaturen, 65°, 70°, 75° und 80°C, erwiesen sich 75°C als geeignet, alle weiteren Versuche wurden bei dieser Temperatur durchgeführt.

Die extrahierten (vergleiche Kap. 5.6.) und hitzedenaturierten (vergleiche 5.12.3.) Kern-Transkripte wurden gegen Gene Sreen-fixierte PSTV RNA und PSTV DNA, die im Dot Blot Verfahren aufgebracht worden waren (vergleiche Kap. 5.10.5.) hybridisiert, autoradiographisch visualisiert (vergleiche Kap. 5.9.3.) und die Intensität der durch sie

verursachten Schwärzung des Films verglichen (siehe Kap. 5.9.4.).

5.12. Radioaktive Markierung der Hybridisierungsproben

Die für den Nachweis PSTV-spezifischer Sequenzen eingesetzten Nukleinsäuren wurden durch Jodierung mit 125 Iodine (von NEN) im Falle der PSTV RNA und durch Phosphorylierung des 5'-OH Endes mit γ - 32 P-ATP (von Amersham International plc) im Falle der Oligodeoxyribonukleotide radioaktiv markiert. Alle radioaktiven Reaktionsansätze wurden in siliconisierten Gefäßen durchgeführt, um Verluste durch Anhaften der Proben an der Gefäßwand zu vermeiden.

5.12.1. Markierung von reinem PSTV mit 125 -Iodine (nach COMMERFORD, 1971)

Zur Jodierung von PSTV wurde die Methode von Commerford (1971), bei der Jodatome kovalent in die 5-Stellung des Cytosinrings eingebaut werden, leicht modifiziert, um eine höhere spezifische Aktivität zu erzielen. Der nicht modifizierte Reaktionsansatz enthielt, zusätzlich zum radioaktiven Jod, nicht radioaktives Kaliumjodid, wodurch die spezifische Radioaktivität stark gesenkt wurde. Das modifizierte Verfahren, in dem nur 125 Jod zugegeben wurde, wurde wie folgt durchgeführt:

Zu 5 μ g hochreinem, lyophilisiertem PSTV wurden 20 μ l 125 Iodine (=2mCi) zugegeben.

Das leere 125 Jod-Gefäß wurde mit folgendem Mix nachgespült und dieser dann der PSTV- 125 J₂-Mischung zugegeben:

3,0 μ l Natriumacetat-Puffer

3,25 μ l Aqua bidest steril

3,75 μ l TlCl₃-Puffer

Dieser Ansatz wurde 20 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Nach Zugabe von

5µl Natriumsulfit-Puffer und
150µl Natriumphosphat-Puffer
wurde der Ansatz 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert
und dann auf Eis abgekühlt.

Für die Abtrennung von nicht umgesetztem $^{125}\text{J}_2$ mittels
Gelfiltration über eine Bio-Gel A 0,5 Minisäule (Pasteur-
pipette mit siliconisiertem Wattestopfen) in 100mM TEAB
(Triethylammoniumbicarbonat) pH 7,6 wurden dem Ansatz
100µl tRNA (1mg/ml) von E.coli und
50µl Glycerin zugesetzt.

Die tRNA sollte die geringe Menge markierte PSTV RNA
kompetitiv vor Abbau-Reaktionen schützen, das Glycerin das
Auftragen der Probe erleichtern.

Der Durchlauf wurde in 100µl-Fraktionen aufgefangen, die
Radioaktivität der Fraktionen gemessen (mit Packard Tri-
carb 460 C Liquid Scintillation System, Fenster A: 0-12,
Fenster B: 12-156) und der 1. Peak gesammelt, vereinigt
und bei -20°C gelagert.

Die Puffer für den Reaktionsansatz wurden alle frisch
hergestellt und, bis auf den TiCl_3 -Puffer, der wegen
seiner geringen Stabilität erst ganz kurz vor seiner Ver-
wendung hergestellt wurde, autoklaviert.

Sie setzten sich folgendermaßen zusammen:

400mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,8:

400mM NaH_2PO_4 mischen mit

400mM Na_2HPO_4 bis pH 6,8 erreicht ist.

100mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5:

1,64g tri-Natriumacetat +

1,14ml Eisessig

mit Aqua bidest ad 200ml auffüllen.

50mM Natriumsulfit-Puffer:

0,31g Na_2SO_3

ad 50ml mit Natriumacetat-Puffer

5mM TiCl_3 -Puffer:
7,7mg TiCl_3 lösen in
5ml Natriumacetat-Puffer

100mM TEAB pH 7,6:

das Einstellen des pH-Wertes erfolgte in der Kälte durch Begasen mit CO_2 , bis ein stabiler Wert zwischen 7,4 und 7,6 erreicht war.

5.12.2. Markierung der Oligodeoxyribonukleotide mit (γ -³²P)-ATP durch T4 Polynukleotidkinase

Die Markierung der Primer geschah nach einem Verfahren, das von Dipl.Chem. Bernd Haas als Synthese aus verschiedenen bekannten Methoden zusammengestellt worden war.

Zu 1mCi lyophilisiertem γ -³²P-ATP (von Amersham) wurden 6 μ l (1,6 μ g) Primer (p 14 I, p 14 II oder p 15),

2 μ l "Reaktionsmix" (siehe unten) und

2 μ l (10 units) T4 Polynukleotidkinase (von NEN)

zupipettiert und 50 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die Reaktion wurde durch 1 min erhitzen auf 100°C gestoppt, der Ansatz auf Eis gekühlt und 10 μ l steriles Aqua bidest zugegeben. Die Trennung von nicht umgesetztem γ -³²P-ATP erfolgte über Sephadex G 50 fine (in einer 10ml Einmalpipette mit siliconisiertem Wattestopfen). Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionskollektor (von Abimed) zu je 20 Tropfen/Fraktion gesammelt, die Radioaktivität gemessen (in Packard Tri-carb 460 C, Fenster A: 12-20, Fenster B: 15-20), der 1. Peak gesammelt und vereinigt und für die Hybridisierung lyophilisiert.

Der "Reaktionsmix" setzte sich folgendermaßen zusammen:

20 μ l 2.5M Tris/HCl pH 7,6

10 μ l 1M MgCl_2

50 μ l 100mM DTT (Dithiothreitol)

1 μ l BSA (50ng/ μ l RNase-frei)

119 μ l Aqua bidest

5.12.3. Hitzedenaturierung der Hybridisierungsproben

Die als Hybridisierungsproben eingesetzte PSTV RNA (^{125}J -PSTV und Kern-Transkripte) mußten aufgrund der hohen Selbstkomplementarität von Viroiden vor dem Hybridisieren hitzedenaturiert werden, um die bestehende intramolekulare Hybridisierung zu lösen und dadurch eine intermolekulare Hybridisierung zu ermöglichen. Dies geschah indem der fertige Hybridisierungspuffer, der die Probe bereits enthielt, für 2 min auf 80°C erhitzt wurde.

5.12.4. Alkali-Behandlung der in vitro Kerntranskripte

Um festzustellen, ob es sich bei den radioaktiv markierten Syntheseprodukten isolierter Zellkerne tatsächlich um RNA handelt, wurden sie vor dem Einsatz als Hybridisierungsprobe mit NaOH degradiert.

Je eine Hälfte der von nicht inkorporierten Mononukleotiden gereinigten, in Aqua bidest gelösten Kerntranskripte (vergl. Kap. 5.5.2.2.), sowie gereinigtes PSTV als Kontrolle, wurden folgender Behandlung unterzogen:

3/7 Volumen 1N NaOH zugeben und

30 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren,

1/7 Volumen 1M Tris-HCl pH 8 und 3/7 Volumen 1N HCl zur Neutralisierung und Pufferung der Lösung zugeben und nach Zugabe von

0,25ng/ml carrier RNA (tRNA von Boehringer)

EtOH-fällen (vergl. Kap. 5.6.).

Auch die nicht behandelten Hälften wurden unter Zugabe von carrier RNA alkoholgefällt.

5.12.5. Siliconisieren der Reaktionsgefäße

Die Siliconisierung der Reaktionsgefäße erfolgte durch kurzes Eintauchen in eine Lösung von 5% Dichlordimethylsilan in Tetrachlorkohlenstoff, wobei auf eine vollständige Benetzung der Gefäße zu achten war, anschließendes Trocknen bei 100°C in einem Trockenschrank (von Heraeus) und Spülen der trockenen Gefäße mit absolutem Ethanol und

reichlich Aqua bidest. Die Gefäße wurden nochmals getrocknet und waren für die Verwendung fertig.

5.13. Textverarbeitung der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde auf einem Personal-Computer der Firma Osborne: Osborne 1, Betriebssystem: CP/M unter Verwendung der Programme "Wordstar" und "dBase II" geschrieben. Der Ausdruck erfolgte auf auf einem "Brother HR-15XL"-Typenraddrucker von der Firma Dantenwill.

Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Aufklärung der Lokalisation der PSTV-Replikation in der Pflanzenzelle und der Beteiligung wirtseigener RNA Polymerasen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Das für die Zellkernisolation entwickelte Verfahren führte zu hochreinen Zellkernfraktionen, deren Polymeraseaktivität erhalten war.
2. Hochreine isolierte Zellkerne enthalten
 - a) zirkuläre und lineare (+)PSTV Monomere,
 - b) die intermediären (-)PSTV Oligomeren bis zu etwa vierfacher Einheitslänge, sowie
 - c) (+)PSTV Oligomere von etwa zwei- und dreifacher Einheitslänge.
3. Im cytoplasmatischen Überstand, der bei der Zellkernisolation anfällt, lassen sich diese Formen nicht ((+)- und (-)PSTV Oligomere) oder nur in Spuren (zirkuläre und lineare (+)PSTV Monomere) nachweisen.

Diese Befunde zeigen, daß im Zellkern alle Replikationsformen des PSTV auftreten während im Cytoplasma nur Spuren des Endproduktes nachweisbar sind, was den Schluß zuläßt, daß der Zellkern der Ort der PSTV-Synthese ist.

4. Die isolierten Zellkerne sind in der Lage in vitro sowohl (+)PSTV als auch (-)PSTV zu synthetisieren.
5. Es wird wesentlich mehr (+)PSTV als (-)PSTV synthetisiert.

Hemmstoffversuche zeigten, daß

6. α -Amanitin die Synthese von (+)PSTV und (-)PSTV in gleicher Weise hemmt, was auf die Beteiligung der DNA-abhängigen RNA Polymerase II weist, während
7. Actinomycin D nur die (+)PSTV- nicht hingegen die (-)PSTV Synthese hemmt, was die Vermutung nahelegt, daß die (+)PSTV Synthese von der nukleolären DNA-abhängigen

RNA Polymerase I bewerkstelligt wird.

Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche führen in Kombination mit der Hemmbarkeit der verschiedenen nukleären RNA Polymerasen durch die verwendeten Inhibitoren zu folgendem vereinfachten Replikationsmodell:

Infektion der Zelle mit zirkulärem (+)PSTV --> dieses gelangt in den Zellkern --> in einem "rolling circle"-artigen Mechanismus werden daran unter Beteiligung der DNA-abhängigen RNA Polymerase II oligomere (-)PSTV Moleküle synthetisiert --> diese dienen als Template für die Synthese der (+)PSTV Oligomeren (unter Beteiligung der nukleolären DNA-abhängigen RNA Polymerase I), die --> auf Einheitslänge geschnitten und zirkularisiert werden.

Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl- paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, Nr.12, 5350-5354, (1977).

App A., Granados R.R.: Isolation of nuclei from rice tissue grown in suspension culture. Planta (Berl.) 120, Nr. 2, 201-205, (1974).

Behnke M.: Regeneration in Gewebekulturen einiger dihaploider Solanum tuberosum-Klone. Z. Pflanzenzüchtg. 75, 262-265, (1975).

Bittner M., Kupferer P., Morris C.F.: Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitro-cellulose sheets. Anal. Biochem. 102, 459-471, (1980).

Branch A.D., Robertson H.D.: A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. Science 223, 450-455, (1984).

Branch A.D., Robertson H.D., Dickson E.: Longer-than-unit-length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6381-6385, (1981).

Branch A.D., Robertson H.D., Greer C., Gegenheimer P., Peebles C., Abelson J.: Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. Science 217, 1147-1149, (1982).

- Bruening G., Gould A.R., Murphy P.J., Symons R.H.: Oligomers of avocado sunblotch viroid are found in infected avocado leaves. FEBS Lett. 148, Nr. 1, 71-78, (1982).
- Chen Y.M., Lin C.Y., Chang H., Guilfoyle T.J.: Isolation and properties of nuclei from control and auxin-treated soybean hypocotyl. Plant Physiol. 56, Nr. 1, 78-82, (1975).
- Commerford S.L.: Iodination of nucleic acids in vitro. Biochem. 10, Nr.11, 1993-2000, (1971).
- Dickson E.: Viroids: infectious RNA in plants, In: Hall T.C., Davies J.W. (Edt.). Nucleic acids in plant. Vol. II CRC Press, Boca Raton, (1979).
- Diener T.O.: Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or in situ. Virology 43, 75-89, (1971).
- Diener T.O.: Viroids. Adv. Virus Res. 17, 295-313, (1972).
- Diener T.O.: Is the scrapie agent a viroid? Nature (New Biol.) 235, 218-219, (1972).
- Diener T.O.: Viroids: The smallest known agents of infectious disease. Ann. Rev. Microbiol. 28, 23-39, (1974).
- Diener T.O.: Viroids: Structure and function. Science 205, 859- 866, (1979).

- Diener T.O.: Portraits of viruses: the viroid. Interviol. 22, 1-16, (1984).
- Diener T.O., Hadidi A.: Viroids. In: Fraenkel-Conrat H., Wagner R.R. (Edt.). Comprehensive virology Vol. XI. Plenum, New York, , (1977).
- Faulstich H.: The Amatoxins. In: Hahn F.E., Kersten H., Kersten W. and Szibalski W. (Edt.). Progress in molecular and subcellular biology, Vol. 7, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 88-134, (1980).
- Faustmann O.: Optimierung des Wachstums, der Viroid-synthese und der Protoplasten-Isolation bei einer Suspensionskultur aus PSTV-infiziertem Gewebe von Solanum demissum. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie an der Universität Gießen, (1982).
- Flores R., Semancik J.S.: Properties of an in vitro system for synthesis of citrus exocortis viroid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6285-6288, (1982).
- Goessens G.: Nucleolar structure. Int. Rev. Cytol. 87, 107-158, (1984)
- Goldman D., Merril C.R.: Silverstaining of DNA in polyacrylamide gels: Linearity and effect of fragment size. Electrophoresis 3, 24-26, (1982).
- Grill L.K., Semancik J.S.: RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected Gynura aurantiaca. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 869-900, (1978).

Gross H.J., Riesner D.: Viroids: A class of subviral pathogens. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, 231-243, (1980).

Großmann K., Seitz U., Seitz H.U.: Transcription and release of RNA in isolated nuclei from parsley petroselinum-crispum cells. Z. Naturf. c 34, 431-435, (1979).

Guilfoyle T.J.: Transcription of the cauliflower mosaic virus genome in isolated nuclei from turnip leaves. Virology 107, 71-80, (1980).

Hall T.C., Wepprich R.K.: Functional distinctions between the ribonucleic acid from citrus exocortis viroid and plant viruses: cell-free translation and aminoacylation reactions. Virol. 61, 486-492, (1974)

Haseloff J., Mohamed N.A., Symons R.H.: Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconut. Nature 299, 316-321, (1982).

Jendrisak J.: Purification, structures and functions of the nuclear RNA polymerases from higher plants. Nato Advanced Study Institutes Survey; Editor: C.J. Leaver, 77-92, (1980).

Kiefer M.C., Owens R.A., Diener T.O.: Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6234-6238, (1983).

- Kikuchi Y., Filipowicz W., Sanger H.L., Gross H.J.: Circularization of linear viroid RNA via 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester bonds by a novel type of RNA ligase from wheat germ and *Chlamydomonas*. *Nucl. Acids Res.* 10, 7521-7529, (1982).
- Kleinschmidt A.K., Klotz G., Seliger H.: Viroid structure. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10, 115-132, (1981).
- Kuehl L.: Isolation of plant nuclei. *Z. Naturf.* 19 b, 525-532, (1964).
- Linsmaier E.M., Skoog F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, 100-127, (1965).
- Locker J.: Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea. *Analyt. Biochem.* 98, 358-367, (1975).
- Mascarenhas J.P., Berman-Kurtz M., Kulikovski R.R.: Isolation of plant nuclei. *Meth. Enzym.* 31, 558-565, (1974).
- McMaster G.M., Carmichael G.G.: Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, Nr.11, 4835-4838, (1977).
- Meinkoth J., Wahl G.: Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138, 267-284, (1984).

- Mennes A.M., Bouman H., van der Burg M.P.M., Libbenga K.R.: RNA-synthesis in isolated tobacco callus nuclei, and influence of phytohormones. *Plant Sci. Lett.* 13, Nr. 4, 329-339, (1978).
- Mennes A.M., Voogt E., Libbenga K.R.: The isolation of nuclei from cultured tobacco pith explants. *Plant Sci. Lett.* 8, 171-177, (1977).
- Mohamed N.A., Thomas W.: Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. *J. gen. Virol.* 46, 157-167, (1980).
- Mühlbach H.P., Faustmann O., Säger H.L.: Conditions of optimal growth of a PSTV-infected potato cell suspension and detection of viroid-complementary longer-than-unit-length RNA in these cells. *Plant Mol. Biol.* 2, 239-247, (1983).
- Mühlbach H.P., Säger H.L.: Multiplication of cucumber pale fruit viroid in inoculated tomato leaf protoplasts. *J. Gen. Virol.* 35, 377-386, (1977).
- Mühlbach H.P., Säger H.L.: Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature* 278, 185-188, (1979).
- Mühlbach H.P., Säger H.L.: Continuous replication of potato spindle tuber viroid (PSTV) in permanent cell-cultures of potato and tomato. *Biosci. Rep.* 1, 79-87, (1981).
- Ohyama K., Pelcher L.E., Horn D.: Rapid, simple method for nuclei isolation from plant protoplasts. *Plant Physiol.* 60, Nr. 2, 179-181, (1977).

- Owens R.A., Diener T.O.: RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 113-117, (1982).
- Owens R.A., Erbe E., Hadidi A., Steere R.L., Diener T.O.: Separation and infectivity of circular and linear forms of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3859-3862, (1977).
- Rackwitz H.R., Rohde W., Sanger H.L.: DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full length copies. *Nature* 291, 297-301, (1981).
- Randles J.W., Rillo E.P., Diener T.O.: The viroidlike structure and cellular location of anomalous RNA associated with the cadang-cadang disease. *Virology* 74, 128-139, (1976).
- Reich E., Goldberg I.H.: Actinomycin and nucleic acid function. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 3, 183-234, (1964).
- Riesner D., Henco K., Rokohl U., Klotz G., Kleinschmidt A.K., Gross H.J., Domdey H., Sanger H.L.: Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.* 133, 85-115, (1979).
- Riesner D., Steger G., Schumacher J., Gross H.J., Randles J.W., Sanger H.L.: Structure and function of viroids. *Biophys. Struct. Mech.* 9, 145-170, (1983).
- Rohde W., Sanger H.L.: Detection of complementary RNA intermediates of viroid replication by northern blot hybridization. *Biosci. Rep.* 1, 327-336, (1981).

- Sänger H.L.: An infectious and replicating RNA of low molecular weight: The agent of the exocortis disease of citrus. *Adv. Biosci.* 8, 103- 116, (1972).
- Sänger H.L.: Structure and function of viroids. In: Prusiner S.B., Headlow W.J. (Edt.). *Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol 2 .* Academic Press, London New York, , (1979).
- Sänger H.L.: Viroide, eine neue Klasse molekularer Krankheitserreger. *Mitt. Ber. Robert-Koch-Stiftung* 1, 71-99, (1979).
- Sänger H.L.: Viroids: Biology, structure and possible functions. In: Leaver C.J. (Edt.). *Genome organization and expression in plants.* Plenum, New York London, , (1980).
- Sänger H.L.: Strucure and possible functions of viroids. *Ann. NY Acad. Sci.* 354, 251-278, (1980).
- Sänger H.L.: Biology, structure, functions and possible origin of viroids. *Encyclop. of Plant Physiol., New Series Vol. 14B. Nucleic Acids and Proteins in Plants II*, 368-454, (1982).
- Sänger H.L.: Minimal infectious agents: the viroids. In: Mahy B.W.J. and Pattison J.R. (Edts.). *Society for General Microbiology Symposium 36. The Microbe 1984: Part I Viruses.* Cambridge University Press (1984).

Sänger H.L., Klotz G., Riesner D., Gross H.J., Kleinschmidt A.K.: Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly basepaired rodlike structures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3852- 3856, (1976).

Sänger H.L., Ramm K.: Radioactive labelling of viroid-RNA. In: Markham R., Davies D.R., Hopwood D.A., Horne R.W. (Edt.). Modification of the information content of plant cells, North-Holland/American Elsevier, Amsterdam, 229-252, (1975).

Sänger H.L., Ramm K., Domdey H., Gross H.J., Henco K., Riesner D.: Conversion of circular viroid molecules to linear strands. FEBS Lett. 99, 117-122, (1979).

Schumacher J., Sänger H.L., Riesner D.: Subcellular localisation of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. EMBO J. 2, Nr. 9, 1549-1555, (1983).

Semancik J.S.: Structure and replication of plant viroids. In: Animal Virology. Academic Press, London New York, , (1976).

Semancik J.S.: Small pathogenic RNA in plants - the viroids. Annu. Rev. Phytopathol. 17, 461-484, (1979).

Semancik J.S., Desjardins P.R.: Multiple small RNA species and the viroid hypothesis for the sunblotch disease of avocado. Virology 104, 117-121, (1980).

- Southern E.M.: Detection of sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517, (1975).
- Stellwag E.J., Dahlberg A.E.: Electrophoretic transfer of DNA, RNA and proteins onto diazobenzylloxymethyl (DBM)-paper. Nucl. Acid Res. 8, Nr. 11, 299-317, (1980).
- Takahashi T., Diener T.O.: Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. Virology 64, 106-114, (1975).
- Tautvydas K.J.: Mass isolation of pea nuclei. Plant Physiol. 47, Nr. 4, 499-503, (1971).
- Thomas P.S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, Nr. 9, 5201-5205, (1980).
- Wahl G.M., Stern M., Stark G.R.: Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzylmethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3683-3687, (1979).
- Widnell C.C., Tata J.R.: Studies on the stimulation by ammonium sulphate of the DNA-dependent RNA polymerase of isolated rat liver nuclei. Biochim. Biophys. Acta 123, 478-492, (1966).
- Willmitzer L., Wagner K.G.: The isolation of nuclei from tissue-cultured plant cells. Exp. Cell Res. 135, Nr. 1, 69-77, (1981).

Zaug A.J., Grabowski P.J., Cech T.R.: Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. *Nature* 301, 578-583, (1983).

Zelcer A., Zaitlin M., Robertson H.D., Dickson E.: Potato spindle tuber viroid-infected tissues contain RNA complementary to the entire viroid. *J. Gen. Virol.* 59, 139-148, (1982).

8. Liste der verwendeten Abkürzungen

ATA	Aurintricarbonsäure
Bisacrylamid	N,N' Methylenebisacrylamid
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Carna 5	Cucumber mosaic virus associated RNA 5
cpm	Impulse pro Minute
2,4 D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
GST Membran	Gene Screen Transfer Membrane
HSA	Hydroxystilbamidin
JAc	Jodessigsäure
MES	Morpholinoethansulfonsäure
NBPC	1-((m-Nitrobenzyloxy)methyl)Pyridinchlorid
NH ₄ -Ac.	Ammonium-Acetat
NP 40	Nonidet P 40
PAA	Polyacrylamid
PP	Natriumpyrophosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSTV	Potato Spindle Tuber Viroid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
rpm	Umdrehungen pro Minute
VRC	Vanadylribonukleosidkomplex

Danksagung

Nach Abschluß dieser Arbeit möchte ich allen danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.L.Sänger und Herrn Dr. Hans-Peter Mühlbach für die Anregung, Beratung und stetige Diskussionsbereitschaft.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Schmieger und Herrn Prof. Dr. W. Rau für ihre Bereitschaft die Arbeit zu betreuen.

Frau Renate Luckinger danke ich für die zuverlässige Unterstützung bei der Anzucht der Zellkulturen.

Frau Karla Ramm danke ich für die Bereitstellung des gereinigten PSTV,

Frau Martina Schnölzer für das Überlassen der von ihr synthetisierten Oligodeoxyribonukleotide, sowie Herrn Martin Tabler, der mir die von ihm klonierte PSTV DNA zur Verfügung stellte.

Herrn Prof. Dr. J. Kaper danke ich für das Zusenden der von ihm isolierten Carna 5 doppelsträngigen RNA.

Meinem Mann Michael danke ich für seine Bereitschaft, mich jederzeit bei Problemen der Textverarbeitung zu unterstützen.

Lebenslauf

Am 25. September 1953 wurde ich als Tochter des Ehepaares Walter und Johanna Spiesmacher, geb. Hinkel, in Gau-Ödernheim, Krs. Alzey, geboren.

Im September 1959 trat ich in die Grundschule in Trostberg, Krs. Traunstein, ein und wechselte Im September 1964 auf das Neusprachliche Gymnasium der Englischen Fräulein in Altötting über, wo ich im Juli 1973 mit dem Abitur abschloß.

Im November 1973 begann ich mit dem Studium der Meteorologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und wechselte im November 1975 zum Studium der Biologie mit Studienziel Diplom, ebenfalls an der Ludwig-Maximilians-Universität, über. Im Herbst 1976 legte ich die Diplomvorprüfung und im Sommer 1980 die Diplomhauptprüfung in den Fächern Anthropologie und Humangenetik, Zoologie und Immunologie ab. Meine Diplomarbeit zum Thema "Mitogenstimulierbarkeit von Rinderlymphozyten; Untersuchung und Vergleich verschiedener Tiergruppen" war zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen.

Im Februar 1981 begann ich in der Abteilung Viroidforschung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried bei Prof. Dr. H.L. Sänger in der Arbeitsgruppe Zellbiologie von Dr. H.-P. Mühlbach mit Untersuchungen zur Viroidreplikation im Zellkern, die mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit abgeschlossen wurden.

